

Activité phosphatasique du squelette des
Poissons osseux ou cartilagineux et bio-
chimie comparée de l'ossification.

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Novembre 1940

PAR

Jacqueline COLLET

née le

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	{	MM. ROCHE, Professeur, <i>Président</i> , CHEVALLIER, Professeur, PETIT, <i>Maître de Conf. Facult. Sc.</i> BALANSARD, <i>Agrégé.</i>	{	Assesseurs.
---------------------------	---	--	---	-------------

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1940

Activité phosphatasique du squelette des
Poissons osseux ou cartilagineux et bio-
chimie comparée de l'ossification.

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Novembre 1940

PAR

Jacqueline COLLET

née le :

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	{	MM. ROCHE, Professeur, <i>Président</i> , CHEVALLIER, Professeur, PETIT, <i>Maître de Conf. Facult. Sc.</i> BALANSARD, <i>Agrégé.</i>	{	Assesseurs.
---------------------------	---	--	---	-------------

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1940

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : A. CHEVALLIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE

Chargés de Cours honoraires : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} GEORGE

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie.....	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie.....	RIMATTEI
Chimie médicale.....	ROCHE
Clinique chirurgicale.....	FIOLE
Clinique chirurgicale.....	BOURDE
Clinique exotique.....	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses.....	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.....	OLMER
Clinique médicale.....	MATTEI
Clinique médicale infantile.....	GIRAUD
Clinique obstétricale.....	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique.....	AUBARET
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	GABRIEL
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale.....	VIOLLE
Médecine légale.....	MOSINGER
Parasitologie.....	JOYEUX
Pathologie interne.....	MONGES
Pharmacodynamie et matière médicale.....	MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie.....	COTTE
Physique.....	CHEVALLIER
Thérapeutique.....	GAUJOUX
Stomatologie (Professeur sans chaire).....	BELTRAMI
Physiologie (Professeur sans chaire).....	MALMÉJAC



Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI

JAYLE

MOIROUD

CARCASSONNE

BERTHIER

POINSO

DUBOULOZ

MM. SAUTET

BALANSARD

BRAHIC

FIGARELLA

SALMON

PAILLAS

MM. ARNOUX

DELPHAUT

IMBERT

AUDIER

CHOSSON

DOR

RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

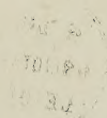
Anatomie descriptive et topographique SALMON

Médecine du travail..... PERIOT

Psychiatrie..... ALLIEZ

Toxicologie GUILLOT

Chimie médicale..... DUMAZERT





Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MON MAITRE,
MONSIEUR LE PROFESSEUR J. ROCHE.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CHEVALLIER.

A MON JURY DE THÈSE.

A MES CHERS PARENTS.

MEIS ET AMICIS.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION	11
CHAPITRE I.	
Existence et rôle physiologique d'une phosphatase dans le système osseux des Vertébrés Supérieurs. Problèmes posés par la biochimie de l'ossification chez les Poissons.....	13
A. — La substance osseuse.....	13
1. — Le support protéique.....	14
2. — Le complexe minéral	15
3. — Le ravitaillement en sels minéraux du stroma protéique	17
B. — La phosphatase des os	18
1. — Classification et identification des phosphatases	18
2. — Caractères de la phosphatase des os..	22
1° Préparation	22
2° Propriétés	22
3. — Localisation et rôle de la phosphatase.	24
4. — Variations de la teneur en phosphatase du tissu osseux au cours des phénomènes physiologiques et pathologiques	28
1° Croissance normale	28
2° Ossification de réparation.....	30
3° Modifications expérimentales ...	32
C. — Notions générales sur les problèmes biochimiques posés par l'ossification dans la classe des Poissons	34
D. — Objet du travail	36
BIBLIOGRAPHIE	37

CHAPITRE II.

Existence, caractères et localisation d'une phosphatase dans les divers organes osseux des Poissons et rapports existant entre la localisation de l'enzyme et la calcification.....	41
A. — Caractère de l'enzyme.....	42
1. — pH optimum d'action	43
2. — Action sur les α et β glycérophosphates.....	44
3. — Activation par les ions Mg^{++}	46
B. — Répartition de la phosphatase dans les divers organes osseux et les téguments des Poissons de divers ordres	49
1. — Localisation dans les os des Téléostéens	50
2. — Localisation de la phosphatase dans les seules parties calcifiées des os des Sélaciens : os squelettiques, os dermiques, dents	54
3. — Absence de phosphatase dans les organes dentaires non calcifiables (cyclostomes)	56
4. — Activité phosphatasique des os dermiques (écailles) et de la peau.....	58
C. — Conclusions	59
BIBLIOGRAPHIE	60

CHAPITRE III.

Activité phosphatasique des os et des dents des Téléostéens et des Sélaciens aux diverses étapes de leur développement et rôle physiologique de la phosphatase dans l'ossification.....	62
A. — Etude de l'activité phosphatasique des divers os de la Sardine méditerranéenne (<i>Clupea pilchardus</i> Walb.) au cours de son développement	63
1. — Introduction	63
2. — Matériel d'étude, contrôle du degré de croissance et techniques	66
1° Matériel d'étude	66
2° Contrôle du degré de croissance	66
3° Techniques	71
3. — Résultats expérimentaux	72
1° Animaux d'âges divers en période de croissance (mars à juillet) ..	72
2° Animaux âgés de plus d'un an étudiés pendant un cycle annuel	

comportant une période de croissance et une période de repos	72
4. — Discussion des résultats et conclusions	76
1° Activité phosphatasique et vitesse de croissance relative des diverses pièces squelettiques ..	77
2° Activité phosphatasique des os et développement du squelette. Métamorphose et poussées saisonnières de croissance	77
3° Modifications saisonnières de l'activité phosphatasique des os, unité physiologique du squelette et coordinations hormonales probables	82
4° Identité du rôle physiologique de la phosphatase des os dans les diverses classes de Vertébrés et biochimie générale de l'ossification	84
B. — Etude de l'activité phosphatasique des dents à divers stades de leur évolution chez un Sélacien [<i>Carcharias Glaucus</i> (L.)]	85
1. — Matériel d'étude et techniques	86
2. — Résultats expérimentaux et discussions.	87
C. — Conclusions	90
1. — Recherches sur l'ossification du squelette chez les Téléostéens.....	90
2. — Recherches sur la formation des dents chez les Sélaciens	91
BIBLIOGRAPHIE	91
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	93

INTRODUCTION.

L'ossification a suscité un très grand nombre de travaux aussi bien chimiques et physiologiques que morphologiques. Mais si les os ont été étudiés dans les moindres détails de leur forme, de leur structure et de leur composition chimique, il n'en est pas de même du mécanisme biochimique de leur formation. Les processus présidant à la génèse et à la fixation des sels minéraux demeurent encore obscurs, malgré les travaux poursuivis depuis 1921 par ROBISON. Le système osseux des Vertébrés supérieurs (os et dents) contient un enzyme opérant le dédoublement des esters phosphoriques, auquel on a donné le nom de phosphatase. Les travaux de ROBISON ont révélé le rôle important que joue cette estérase dans les processus de l'ossification du squelette chez les Mammifères et les Oiseaux. C'est, en effet, sur elle que repose le mécanisme d'enrichissement en ions phosphoriques ($\text{PO}_4^{\equiv}$) du milieu environnant la substance osseuse durant sa formation. Cette donnée marque le progrès le plus important de la biochimie de l'ossification au cours des vingt dernières années. Les résultats obtenus par ROBISON ne peuvent être étendus sans contrôle à tout l'embranchement des Vertébrés.

Ceci étant, le Professeur J. ROCHE a pensé que l'étude du rôle de cet enzyme dans l'ossification des Poissons, devait permettre, en raison du matériel d'étude très varié qu'elle offre, d'aborder des problèmes dont l'intérêt relève de la biochimie aussi bien générale que comparée. Il a bien voulu me confier une partie de ce travail, au cours duquel ses directives et ses conseils éclairés m'ont été d'un encouragement constant.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de ma profonde reconnaissance.

Ce travail comprend trois chapitres qui traitent respectivement de :

I. L'existence et le rôle d'une phosphatase dans le système osseux des Vertébrés supérieurs, et les problèmes posés par la biochimie de l'ossification chez les Poissons.

II. L'existence, les caractères et la localisation d'une phosphatase dans les divers organes osseux des Poissons (Cyclostomes, Sélaciens, Téléostéens) et les rapports existant entre la localisation de l'enzyme et la calcification des pièces squelettiques.

III. L'activité phosphatasique des os et des dents des Téléostéens et des Sélaciens aux diverses étapes de leur développement et le rôle physiologique de la phosphatase dans l'ossification.

CHAPITRE I.

Existence et rôle physiologique d'une phosphatase dans le système osseux des Vertébrés supérieurs.

Problèmes posés par la biochimie de l'ossification chez les Poissons.

Avant d'aborder l'étude des problèmes posés par l'existence d'une phosphatase dans le système osseux des Vertébrés supérieurs, il convient de faire un bref rappel de la biochimie générale de l'ossification, en examinant successivement la composition des os et le mécanisme de leur formation.

A. — La substance osseuse.

Le squelette est formé d'*organes osseux* qui sont constitués par un ensemble d'éléments hétérogènes : tissus fibreux (périoste et périchondre), moëlle osseuse, parfois cartilage, et enfin *tissu osseux*. Deux éléments, histologiquement et chimiquement différents, entrent en proportion variable dans le tissu osseux, à savoir : une substance conjonctive molle non calcifiée et la *substance osseuse* dure et calcifiée. Le rapport : substance osseuse/substance conjonctive, est beaucoup plus élevé pour le tissu compact de la diaphyse des os longs que pour le tissu spongieux des épiphyses de ces mêmes os ou pour les os courts.

La substance osseuse apparaît comme un constituant histologique particulier, caractérisé par une dureté et une résistance spéciales, qualités qui lui sont conférées l'une par un *complexe phospho-calcaire*, l'autre par un *stroma protéique* servant de support à ce complexe (POLICARD et ROCHE [24]).

Ces deux éléments, organique et minéral, que l'on rencontre dans toute calcification, présentent cependant des particularités assez notables dans l'os pour que l'on ait pu différencier calcification et ossification. D'une part la matrice protéique de la substance osseuse forme une sorte de feutrage fibrillaire spécial auquel l'os est redevable d'une solidité et d'une élasticité faisant défaut aux tissus calcifiés. D'autre part le complexe phosphocalcaire se présente dans l'os sous un état microcristallin.

La formation de la substance osseuse peut relever d'un processus *membraneux* (calcification directe d'un support protéique), *endochondral* (calcification d'un tissu conjonctif ayant envahi une région cartilagineuse morte), ou *haversien* (substitution à un os primitif d'un os secondaire plus dense). Notons en passant que la formation des dents revêt un caractère particulier du fait de leur hétérogénéité.

Mais, quelles qu'en soient les modalités, la genèse de la substance osseuse est dominée par deux processus : d'une part, *la formation d'une matrice protéique apte à fixer spécifiquement les sels phosphocalciques*, et, d'autre part, *le ravitaillement en matériel minéral de celle-ci*. Nous nous bornerons à faire ici un bref rappel de ces questions en soulignant que l'étude chimique de l'os au point de vue statique, commencée depuis longtemps, est relativement avancée, tandis que celle de la formation de la substance osseuse, beaucoup plus récente est à peine ébauchée.

1. — Le support protéique.

Le stroma protéique, partie fondamentale de la substance osseuse, sert de support aux sels phosphocalciques. Mais ce tissu conjonctif ne fixe les sels qu'après de profondes transformations chimiques et structurales. Le remaniement à la suite duquel le tissu conjonctif devient apte à se calcifier comporterait, selon POLICARD [21], trois phases :

Les fibrilles collagènes se multiplient d'abord considérablement et s'orientent, en même temps que leurs propriétés chimiques se modifient. Il se forme ensuite un œdème spécial, visible au microscope (œdème préosseux). Enfin le territoire conjonctif devient homogène et présente une réfrin-

gence particulière : Tout se passe comme s'il était alors imprégné d'une substance particulière que l'on a nommée « la substance préosseuse » (POLICARD et LERICHE [22]), en attendant de pouvoir mieux la définir. A partir de ce stade et très rapidement les sels calcaires se déposent. La rapidité de la succession de ces phénomènes rend très difficile l'étude de la substance préosseuse. Il a été à peu près impossible jusqu'à l'heure actuelle de l'isoler, et l'on sait encore peu de chose à son sujet. On admet généralement avec VON EBNER que la fixation du calcaire est opérée non par les fibres collagènes mais par la substance interfibrillaire.

On a pu isoler dans le complexe organique constituant le stroma protéique, en dehors d'une osséomucoïde et d'une osséoalbumine, de l'osséine qui seule est assez bien connue. C'est une protéine qui par l'action combinée de la chaleur et de la pression se transforme en gélatine.

Le complexe protéique de l'os est en somme assez mal défini ; aussi les problèmes relatifs à sa formation et à son évolution sont-ils obscurs.

2. — *Le complexe minéral.*

L'étude du complexe minéral est beaucoup plus avancée que celle du complexe organique. Les nombreux travaux chimiques effectués sur l'os montrent la multiplicité des éléments qui entrent dans sa composition. A côté de ceux qui s'y trouvent en grande quantité comme le calcium, le phosphore, les radicaux carboniques, on y rencontre en proportion moindre des métaux tels que le magnésium, le potassium, le sodium, sans parler de la présence de métalloïdes tels que le chlore, le fluor et de celle, accidentelle, de métaux lourds. Le calcium constitue environ 36 p. 100 de la partie minérale de l'os. Ensuite, dans l'ordre progressivement décroissant des valeurs, viennent le phosphore (16 p. 100 environ) puis le radical carbonique (3 p. 100). Le sodium et le magnésium n'y existent qu'en faibles quantités (en général moins de 0,5 p. 100).

Si la composition minérale des os est bien connue, il n'en est pas de même de la nature des molécules salines contenues dans ces organes. Le phosphore existe dans l'os à l'état de phosphate de calcium et accessoirement de magnésium. On admet en général que le phosphate de calcium de l'os est tri-

calcique (J. BOGERT et B. HASTINGS [5]) et non monocalcique (SHEAR, WASBURN et KRAMER [41]). Mais le calcium n'existe pas seulement dans le squelette à l'état de phosphate ; on l'y trouve aussi sous forme de carbonate (CO_3Ca) qui, pour certains auteurs, serait mélangé à l'hydroxyde $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$. Phosphate de calcium, carbonate de calcium et peut-être hydroxyde de calcium sont donc les principaux composés de ce que l'école anglaise a nommé le « sel de l'os ». Ces composés sont-ils combinés entre eux, ou bien coexistent-ils en un simple mélange ?

SHEAR et KRAMER [42], HOLT, LA MER et CHOWN [13, 14] estiment qu'ils forment un mélange de composition variable ; mais la plupart des biochimistes (ROBISON, BOGERT, HASTINGS, LOGAN) optent pour l'existence d'un complexe stable de l'os, du groupe des apatites : $[\text{3}(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3 \cdot \text{X Ca}]$, X étant un radical divalent ou 2 radicaux monovalents. L'étude du spectre de diffraction des rayons X a révélé la structure cristalline du complexe. L'os ne contient sans doute pas une seule apatite, mais un mélange de plusieurs de ces corps, dont les plus importants seraient la carbonato-apatite, à côté de laquelle existeraient l'hydroxy-apatite $[\text{3}(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$, la fluoro-apatite $[\text{3}(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3 \cdot \text{Ca F}_2]$, la chloro-apatite $[\text{3}(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3 \cdot \text{Ca Cl}_2]$, et enfin des magneso-apatites dans lesquelles le magnésium remplacerait le calcium.

L'hypothèse d'un mélange variable et celle d'un complexe stable sont l'une et l'autre trop exclusives et laissent entre elles place à une donnée de conciliation. A. ROCHE et GARCIA [30] estiment que dans l'os coexistent un complexe stable de différentes apatites cristallines et un mélange de sels amorphes mobilisables selon les besoins de l'organisme. Telle est également la conclusion des recherches de von HEVESY basées sur l'emploi de phosphore radioactif comme « indicateur » des ions PO_4^{4-} fixés ou mis en liberté par l'os au cours de diverses conditions expérimentales. Quoi qu'il en soit, le « sel de l'os » présente une certaine labilité. Il est difficile de considérer cette hypothèse comme exclusive. Toutefois il faut remarquer que selon de nombreux auteurs, en particulier HUGOUNENCO, on peut observer des modifications importantes de la teneur des os en carbonate de calcium au cours de la vie et que, selon LOGAN et TAYLOR [15], on constate sur des os immergés dans des solutions plus

ou moins riches en carbonate le remplacement des ions PO_4^{4-} de l'os par les ions CO_3^{2-} des solutions, ce qui traduit une certaine labilité des phosphates.

3. - *Le ravitaillement en sels minéraux du stroma protéique.*

Comment se fait l'apport du matériel phospho-calcique et sous quelle forme s'opère le dépôt des sels ? Le principal sel de l'os étant un phosphocarbonate de calcium, les éléments contribuant à sa formation peuvent être *a priori* des complexes du groupe carbonato-phosphocalcique, des molécules de sels simples : $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$, $\text{CO}_3 \text{Ca}$, des ions : PO_4^{4-} , Ca^{++} , CO_3^{2-} . La matrice protéique peut fixer soit les molécules, soit les ions avant leur combinaison. L'os en voie de formation baigne dans une lymphe interstitielle chargée des éléments nécessaires à sa calcification. Ces éléments sont apportés à la lymphe par le sang et il existe un équilibre constant entre ces deux milieux. Les bicarbonates se trouvant naturellement dans le sang, l'apport des radicaux carbonyles à l'os ne pose pas de question particulière. Par contre le sang ne contient que des quantités minimales de phosphate et de calcium, soit 3 à 6 mg. P et 6 à 12 mg. Ca par 100 cm³. Ces éléments sont répartis entre des ions Ca^{++} et PO_4^{4-} , ou dans les molécules de phosphates et d'esters phosphoriques dialysables, ou dans des complexes colloïdaux non dialysables. Les ions et les molécules simples peuvent parvenir jusqu'à la lymphe baignant la substance osseuse. Il n'en est pas de même pour les colloïdes. Cependant l'intérêt de leur présence semble résider dans le fait qu'ils constituent dans le sang des réserves d'ions phosphoriques et calciques, libérables grâce aux équilibres existant entre eux et les ions PO_4^{4-} et Ca^{++} . Les molécules de $\text{CO}_3 \text{Ca}$ et de $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$ ne constituent qu'un apport minime en raison de leur faible solubilité. Le rôle primordial est donc dévolu aux ions Ca^{++} et PO_4^{4-} .

Le calcium et le phosphore étant portés à pied d'œuvre, quels sont les mécanismes présidant à leur dépôt ? D'après la loi d'action de masse, le produit : $[\text{PO}_4^{4-}] \cdot [\text{Ca}^{++}]$, ou produit de solubilité, S , est égal à la concentration en $[(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3]$, molécules non dissociées en solution.

$$[\text{PO}_4^{4-}]^2 \cdot [\text{Ca}^{++}]^3 = [(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3]^3 = S = \text{Cte.}$$

Or $[(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3]$ est constant pour une pression et une tempé-

rature déterminées. Suivant LOGAN et TAYLOR, dans le cas particulier de l'os, $[(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3]$ est en outre fonction de la quantité relative de substance osseuse solide et de lymphe. Si l'un des facteurs du produit, $[\text{PO}_4^{\pm}]$ ou $[\text{Ca}^{++}]$, augmente, l'équilibre se rétablit par formation de $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$, et comme le milieu en est déjà saturé, il précipite. Tandis que la concentration en ions Ca^{++} des humeurs ne paraît guère susceptible de modifications sensibles, il n'en est pas de même pour celle de l'ion $\text{PO}_4^{\pm}$. Aussi tout l'enrichissement du milieu en ions phosphoriques, aux dépens des esters phosphoriques du sang, provoque-t-il la formation de phosphate tricalcique. La phosphatase des os a pour rôle physiologique d'assurer l'augmentation du taux des ions $\text{PO}_4^{\pm}$ dans les humeurs.

B. — La phosphatase des os.

Les travaux entrepris il y a une trentaine d'années par SUZUKI, YOSHIMURA, TAKAHASHI, (1907), ont mis en évidence l'existence des enzymes hydrolysant les esters phosphoriques. Plus tard, GROSSER et HUSLER (1912), PLIMMER (1913), constatent leur présence dans divers tissus animaux.

Cependant l'intérêt d'estérases de ce type n'apparût pas clairement tout d'abord. C'est vers 1920 que ROBISON devait révéler le rôle et l'importance de la phosphatase des os dans les processus de calcification : des épiphyses de jeunes Rats en croissance (région riche en enzyme) ayant été placées dans une solution de glucosemonophosphate de baryum, ROBISON vit se former un précipité de phosphate de baryum au niveau du cartilage de conjugaison et il pensa qu'un phénomène analogue à celui-ci, mais dans lequel le calcium remplaçait le baryum, devait se produire « *in vivo* » au niveau des os. Cette observation lui permit d'envisager le rôle physiologique de la phosphatase dans l'ossification.

I. — Classification et identification des phosphatases.

De nombreux travaux ont par la suite montré que les phosphatases sont très répandues dans la nature, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. On les trouve dans les feuilles de choux, de tabac, de conifères etc... ainsi que chez diverses moisissures et bactéries. Les levures qui, au cours

TABLEAU I.
Classification générale des Phosphatases.

Classe de l'enzymes	Substrats hydrolysés	Produits d'hydrolyse
A. Phosphomonoestérases.....	Monoesters de l'acide orthophosphorique $\text{O} = \text{P} \begin{array}{l} \nearrow \text{OR} \\ \searrow \text{OH} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$ nucléotides	Acide orthophosphorique PO_4H_3 + alcool de l'ester ROH
B. Phosphodiestérases.....	Diesters de l'acide orthophosphorique $\text{O} = \text{P} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} - \text{R} - \text{O} \\ \searrow \text{OH} \quad \text{HO} \nearrow \text{P} = \text{O} \\ \searrow \text{OH} \quad \text{HO} \end{array}$	Acide orthophosphorique PO_4H_3 + ester monophosphorique
C. Pyrophosphatases.....	Sels et diesters symétriques de l'acide pyrophosphorique	Sels de l'acide orthophosphorique
D. Métaphosphatases.....	Sels de l'acide métaphosphorique	Sels de l'acide orthophosphorique
E. Phosphoamidases.....	Amides de l'acide phosphorique	Acide orthophosphorique, corps azoté

TABLEAU II.
Classification des Phosphomonoestérases.

Sous classe	Localisation de l'enzyme	pH optimum d'action	Vitesses relatives d'hydrolyse des α et β glycérophosphates	Effet de Mg^{++}
A_1	Os Rein Intestin Glandes mammaires Plasma Leucocytes	9, 10	$\beta > \alpha$	active
A_2	Son de riz Rate, Foie Pancréas Reins	4, 5	$\beta > \alpha$	n'active pas
A_3	Takadiastase de l' <i>Aspergillus orizae</i>	3, 4	$\beta > \alpha$	active l'hydrolyse de l' α et diminue celle du β glycérophosphate.
A_4	Globules rouge Levures	6	$\alpha > \beta$	active

de la fermentation alcoolique des glucides hydrolysent des esters hexoséphosphoriques, en sont riches. Les nombreuses recherches effectuées sur différents tissus animaux, principalement de Mammifères et d'Oiseaux, permirent de préciser la répartition de la phosphatase dans divers organes. Elle existe à peu près dans tous les tissus sauf dans le cartilage hyalin (Mac FARLANE, PATTERSON et ROBISON [16] ; POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCAUMONT [23]. L'intestin, les reins et le système osseux en sont particulièrement riches.

Les biochimistes se sont alors demandé si cette phosphatase, présente dans tant de tissus différents, était unique ou multiple et si celle trouvée dans l'os était identifiable aux autres estérases. Les recherches effectuées permirent d'en distinguer différents types. FOLLEY et KAY [10] ont établi une classification qui, pour n'être pas définitive, n'en est pas moins fort utile (Tableaux I et II). Cette classification, basée d'une part sur la spécificité de l'enzyme vis-à-vis de divers esters phosphoriques, d'autre part sur le pH optimum et l'activation par l'ion Mg^{++} , groupe les phosphatases en 5 classes :

Les *phosphoamidases* dédoublant les amides de l'acide phosphorique ; Les *métaphosphatases* transformant les métaphosphates en sels de l'acide orthophosphorique ; Les *pyrophosphatases* agissant sur les pyrophosphates et les esters phosphoriques ; Les *phosphodiesterases* capables d'hydrolyser les diesters de l'acide phosphorique ; Enfin les *phosphomonoesterases* agissant spécifiquement sur les monoesters de l'acide phosphorique. Elles présentent pour nous un intérêt particulier, car la phosphatase de l'os est l'une d'entre elles.

Ce dernier groupe se subdivise en 4 types A_1 , A_2 , A_3 , A_4 caractérisés par leur pH optimum d'action, leur activité vis à vis des α et β glycérophosphates, les modifications de leur activité par l'ion Mg^{++} (tabl. II). « L'enzyme de l'os » est une monophosphoestérase A_1 , du type alcalin. Il existe également dans divers tissus des Mammifères : reins, intestins, glandes mammaires, poumons, plasma sanguin, leucocytes.

Nous allons la décrire plus en détail.

2. — *Caractères de la phosphatase des os.*

Préparation. — Les caractères de cette monophosphoestérase A_1 ont été étudiés sur un produit préparé suivant la technique de MARTLAND et ROBISON [17]. Des os de jeunes Mammifères sont minutieusement nettoyés, broyés et mis à macérer dans de l'eau additionnée de quelques gouttes de chloroforme. Après un séjour de 7 jours à la température ordinaire, l'extrait est filtré. Ce filtrat, additionné d'alcool et d'éther, précipite un produit renfermant la majeure partie de la phosphatase ; ce précipité est recueilli et desséché sous vide.

Le produit, ainsi obtenu, renferme la phosphomonoestérase A_1 de la classification de FOLLEY et KAY. Il n'est pas homogène, mais contient un mélange de phosphatases. En effet M. le Professeur J. ROCHE et M. LATREILLE [36] sont parvenus à l'aide d'adsorbants spécifiques à séparer des parties inactives sur certains monoesters (phénylphosphates) et actives sur d'autres (glycérophosphates). Il est également certain que cet enzyme du type A_1 se trouve dans le sérum où sa teneur est influencée (BODANSKY et KAY) par un apport enzymatique osseux, rénal, intestinal et leucocytaire. Par ailleurs, il est remarquable que la phosphatase de ces différents organes ne soit pas identiquement inhibée par les fluorures et oxalates (BELFANTI, CONTARDI, ERCOLI [1, 2]). Il n'est donc pas impossible de penser qu'il existerait plusieurs phosphomonoestérases A_1 .

Propriétés. — Les propriétés de cette phosphatase n'en présentent pas moins un grand intérêt. En effet, même si nous n'observons que la résultante d'actions multiples, celle-ci reste néanmoins le processus qui intervient au niveau de l'os. L'activité de la phosphatase est modifiée par la température, le pH, et par certains ions, en particulier Mg^{++} . Enfin l'intensité de son action hydrolysante est variable vis à vis des différents esters phosphoriques.

Son optimum d'action à 37° est en milieu alcalin, à $pH = 9,5$. L'élévation de température est favorable tant qu'il n'y a pas dénaturation du support protéique de l'enzyme. Le temps nécessaire à cette destruction est en relation avec la température

et le pH. On a constaté que, l'enzyme étant rapidement inactivé à 37° en milieu de pH = 9,5, l'optimum d'action moyen, pour des expériences évoluant plusieurs heures à 37°, trouve des pH légèrement inférieurs à 9.

La phosphomonoestérase non fractionnée hydrolyse tous les monoesters-phosphoriques, en particulier les acides α et β glycérophosphoriques, acides hexosemono- et diphosphoriques, acides dioxyacétonemonophosphoriques, acides monoéthyl- et monophénylphosphoriques, et les nucléotides.

Son action aboutit à la formation de l'acide orthophosphorique $O=P(OH)_3$ et de l'alcool de l'ester (glycérol, phénol etc...). Pour ces divers substrats la vitesse d'hydrolyse est différente. C'est ainsi que l'enzyme dédouble plus facilement les acides monophénylphosphoriques que les acides hexosephosphoriques ou glycérophosphoriques. Enfin, son action est plus rapide sur les β que α glycérophosphates.

La phosphatase est susceptible d'être activée par certains ions et principalement par l'ion Mg^{++} , ainsi que l'a découvert ERTDMANN [6] en 1927. JENNER et KAY [11] ont montré qu'il existe une concentration optimum en ions Mg^{++} dont dépend l'activation de l'enzyme ; l'ion Mg^{++} en très faible quantité augmente d'abord considérablement le pouvoir enzymatique en le portant rapidement à son maximum, au delà duquel son action devient moins importante. Il ne modifie pas le pH optimum (BAMANN, RIEDEL ; ROCHE et BULLINGER [34]). De plus, les recherches relatives à l'action du magnésium sur le pouvoir phosphotasique d'os d'animaux en période de croissance ou adultes montrent que dans le premier cas l'activation produite est faible ou nulle, tandis qu'elle est beaucoup plus considérable dans le second cas (J. ROCHE et FILIPPI [38]).

A côté de Mg^{++} il existe d'autres activateurs, tels que les acides aminés et les polypeptides (BODANSKY [3]). L'arséniate de Na, le magnésium seraient selon divers auteurs des activateurs ou des inhibiteurs. BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [1, 2] estiment que les fluorures et les oxalates sont des inhibiteurs spécifiques de la phosphatase des os. Les premiers empêchent par ailleurs l'action de Mg^{++} .

3. — *Localisation et rôle de la phosphatase.*

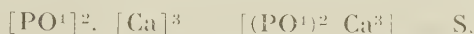
Le rôle de la phosphatase dans l'ossification a fait l'objet d'un grand nombre de travaux que nous résumerons brièvement.

ROBISON et son école, s'attachant à l'étude de la phosphomonoestérase, constatèrent certains faits dont les plus caractéristiques sont les suivants. Au cours de la vie embryonnaire des Mammifères, une activité phosphatasique considérable apparaît dans les tissus en même temps que les premiers points d'ossification, et durant la croissance, l'intensité de la calcification des os longs et la teneur en phosphatase vont de pair. De plus ROBISON [26], puis POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCAUMONT [23] remarquèrent que l'enzyme est présent dans toutes les parties de l'os, sauf dans le cartilage hyalin d'où elle est totalement absente. Le cartilage de conjugaison au contraire en est très riche, et plus encore la partie métaphysaire adjacente, au niveau de laquelle les phénomènes de calcification sont les plus intenses (ROBISON, PATTERSON et MAC FARLANE ; ROCHE et FILIPPI).

Ces faits mettent en relief l'existence d'une relation entre l'ossification et l'activité phosphatasique. Deux expériences très simples ont permis à ROBISON de définir la valeur de ce parallélisme en choisissant comme matériel d'étude les épiphyses du tibia du Rat en croissance. Cette partie de l'os, chez les animaux au début de leur évolution, comprend une zone assez abondante du cartilage de conjugaison très riche en phosphatase, ainsi que nous venons de le voir. ROBISON immergea des coupes d'épiphyses dans une solution aqueuse d'hexosemonophosphate de sodium. Après quelques heures, il constata le dédoublement de ce corps en phosphate de sodium et hexose. L'expérience répétée avec un sel de baryum, le glucosephosphate de baryum, donna naissance à du glucose et à un précipité de phosphate de baryum formé à partir des ions PO_4^{4-} et Ba^{++} .

ROBISON pensa que, dans les humeurs baignant les os, il se produisait des phénomènes analogues, mais dans lesquels le calcium remplace le baryum, la phosphatase de l'os, agissant sur les divers substrats phosphoriques des humeurs environnantes produisant un enrichissement local en ions PO_4^{4-} qui,

en présence des ions Ca^{++} , forment du phosphate tricalcique $(\text{PO}_4)^{2-}\text{Ca}^3$, dont le produit de solubilité très faible, S, régit la précipitation :



Cette opinion demandait à être vérifiée. La démonstration de son exactitude fut fournie par deux séries d'expériences :

1° des coupes d'épiphyes de jeune Rat sont mises à macérer dans une solution de sels de calcium solubles, $\text{Cl}^2 \text{Ca}$ par exemple. On constate que l'addition progressive d'un phosphate soluble détermine la formation de phosphate tricalcique se fixant sur le cartilage et produisant ainsi une véritable calcification dont l'intensité est en relation avec la quantité de phosphate ajoutée.

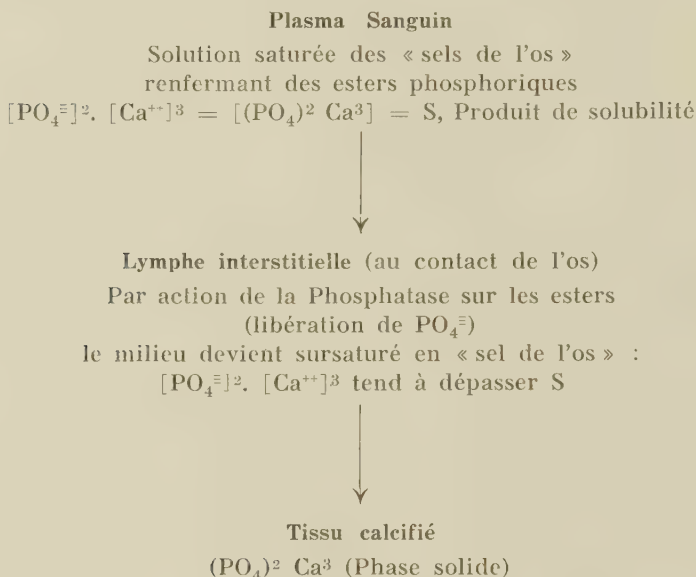
2° une seconde expérience permet de mieux réaliser la complexité des éléments contenus dans les humeurs baignant les os : Dans une solution contenant du $\text{Cl}^2 \text{Ca}$ (10 mg. Ca p. 100 cm^3) et du PO_4KH^2 (à 5 mg. P p. 100 cm^3), à $\text{pH} = 7,7$ et à une température de 37° , on immerge comme précédemment des coupes d'épiphyes de tibia de jeune Rat ; on ajoute peu à peu, non plus du phosphate, mais un ester phosphorique (glycérophosphate de sodium par exemple) dont le dédoublement provoquant la libération d'ions PO_4^{--} nécessite l'action de la phosphomonoestérase. Cette fois-ci encore on observe la calcification du cartilage, calcification d'autant plus importante que la quantité de glycérophosphate employée est plus grande.

Le rôle de l'enzyme ainsi mis en évidence est souligné par le fait suivant. Si l'on renouvelle l'expérience précédente en inhibant préalablement la phosphatase par la chaleur, laquelle laisse cependant absolument intacte l'aptitude du cartilage à fixer des sels, la calcification ne se produit plus.

A ces expériences « *in vitro* » s'ajoutent les résultats de diverses expériences ou constatations « *in vivo* » : par exemple des fragments d'épithélium vésical, greffés sur la paroi abdominale d'un Lapin, sont susceptibles de se calcifier (HUGGINS, LERICHE et FONTAINE) et seules les greffes se calcifiant contiennent de la phosphatase.

Enfin, ROBISON et FELL [8, 9] ont montré qu'au cours de l'ostéogénèse la quantité de phosphatase était parallèle à l'intensité de la calcification dans les os longs de Mammifères ou

d'Oiseaux. C'est à la lumière de ces faits que ROBISON établit son schéma.



Ce schéma répond au mécanisme local d'enrichissement en ions $\text{PO}_4^{\equiv}$ examiné plus haut. Il rend compte des expériences que nous venons d'exposer. Cependant il envisage trop étroitement le mécanisme complexe de la calcification.

Il apparaît aujourd'hui qu'il est insuffisant, étant donné de nouveaux faits mis en évidence. ROBISON lui-même s'en est rapidement rendu compte ; à cette phase de la calcification, qu'il a nommée « le premier mécanisme », il a opposé un « second mécanisme ». En effet, un certain nombre d'expériences révèlent que des calcifications peuvent se produire en dehors de tout processus phosphatasique. C'est ainsi que l'on constate chez un Lapin soumis à une hypervitaminose D, la calcification de l'aorte dont les parties cartilagineuses ne renferment pas de phosphatase. Par ailleurs les réserves osseuses de phosphate tricalcique des os des Mammifères adultes s'organisent dans un squelette pratiquement dépourvu du même enzyme (ROCHE, PHILIPPI et LÉANDRI). En dehors de ces calcifications sans participation phosphatasique, dont l'exemple ci-dessus est typique, il existe des tissus à activité phosphatasique très élevée et ne se calcifiant pas. C'est ainsi que chez l'em-

bryon de Poulet l'ébauche du fémur présente au premier stade de son développement un pouvoir estérasique puissant, bien qu'aucun dépôt en sel minéral ne se forme. Il en est de même chez le jeune Rat rachitique : le cartilage de conjugaison, très riche en phosphatase, ne s'ossifie pas (POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCAUMONT [23]). Il ressort de ces faits que la formation et la précipitation de phosphate tricalcique ne contribue pas seules à la calcification des tissus. Il faut que le tissu soit apte à fixer les sels, et cela d'ailleurs par un mécanisme encore mal connu. La fixation des sels calciques par la substance préosseuse relève selon certains auteurs d'un processus d'adsorption (BENJAMIN), selon d'autres d'une réaction chimique qui pourrait être ainsi schématisée (FREUDENBERG et GYÖRGY [12]) :

I. Protéine + Ca = Protéinate de calcium.

II. Protéinate de calcium + Phosphate = Phosphoprotéinate de calcium.

III. Phosphoprotéinate de calcium = Phosphate tricalcique + protéine.

A ces deux faits correspondent ce que ROBISON a distingué sous les noms de premier et second mécanisme de l'ossification, bien qu'il n'y ait pas deux mécanismes, mais plutôt deux phases de ce processus (ROCHE et FILIPPI). La première phase consiste en l'apport de matériel nécessaire à la formation du « sel de l'os », phase pendant laquelle la phosphatase joue un rôle important en contribuant à l'enrichissement du milieu en $\text{PO}_4^=$ par le dédoublement des esters phosphoriques. La fixation du sel de l'os s'opère dans une seconde phase, qui exige la présence d'une protéine spéciale au niveau du tissu ossifiable. Ces deux phases, indépendantes l'une de l'autre, sont mises en évidence par l'expérience suivante de ROBISON et son école :

Une coupe d'épiphyse de tibia de jeune Rat (c'est-à-dire d'une région comportant du cartilage de conjugaison apte à se calcifier) est plongée dans une solution d'hexosemonophosphate de calcium ; le cartilage s'ossifie normalement. Par contre, en présence de fluorures, ou d'iodacétates l'activité phosphatasique n'est pas inhibée, mais le cartilage ne fixe plus les sels phosphocalcaires, qui cependant continuent à se former et à précipiter. Mais, au contraire, si on détruit seulement la phosphatase, à l'aide de la chaleur dans certaines conditions

par exemple, on constate que le cartilage est susceptible de se calcifier quand il est placé dans un milieu suffisamment riche en sels minéraux.

Tous ces faits prouvent que le rôle de la phosphatase, très important d'ailleurs, se limite à favoriser l'ossification en enrichissant le milieu en ions $\text{PO}_4^{\pm}$.

L'étude qualitative de l'enzyme a permis d'établir le rôle qu'il joue dans l'ossification. Mais c'est de son étude quantitative que ressort beaucoup plus nettement encore son importance.

4. — *Variations de la teneur en phosphatase du tissu osseux au cours des phénomènes physiologiques et pathologiques.*

§ 1. *Croissance normale.* — La variabilité de l'activité phosphatasique avait déjà été mentionnée par ROBISON et son école, sans toutefois avoir été déterminée avec précision.

En effet, la technique employée alors ne permettait pas de savoir si les variations mises en évidence étaient bien dues à une augmentation de l'activité enzymatique ou au simple fait que le poids de l'os auquel elles étaient rapportées peut varier considérablement selon le degré de minéralisation.

Une technique mise au point par J. ROCHE et A. FILIPPI [38] a permis d'obtenir des résultats précis sur la teneur en enzyme des os, à partir desquels il a été possible de tirer diverses conclusions. Ces auteurs ne rapportent plus l'activité phosphatasique à un poids d'os mais à la matrice protéique de celui-ci, ce qui écarte l'erreur due à la plus ou moins grande quantité de sels minéraux présents.

Les travaux poursuivis à l'aide de cette technique ont établi que chez les Oiseaux et les Mammifères la teneur en enzyme du tissu osseux est variable selon le degré de croissance de l'animal. Les modifications observées sont synchrones dans les os longs du squelette et dans les différentes parties de ces os longs, qu'elles contiennent ou non du cartilage de conjugaison.

L'activité enzymatique est très élevée au début de la croissance. Puis, la première étape de croissance dépassée, elle diminue rapidement pour arriver à un minimum peu variable pendant l'âge mûr et la vieillesse comme en témoigne la figure 1.

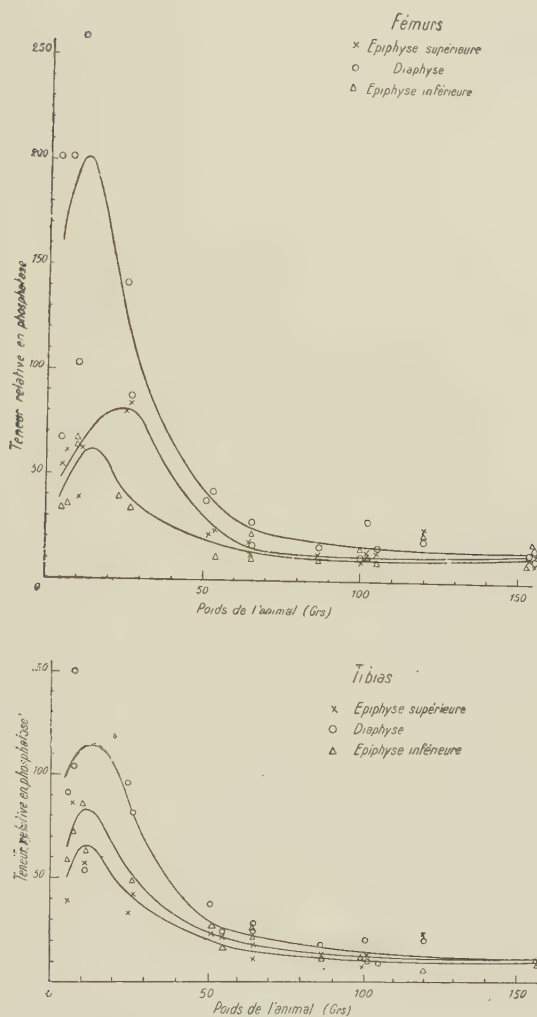


FIGURE 1. — Teneur relative en phosphatase du tibia et du fémur de Rat au cours de la vie.

Abscisses : poids des animaux ;

Ordonnées : activité phosphatasique relative.

(Figure empruntée à J. ROCHE et A. LÉANDRI [35].

Ces données, comparées à celles apportées par l'étude de la minéralisation de l'os chez les mêmes animaux (fig. 2), font apparaître que le maximum d'activité phosphatasique ne correspond pas à la fixation maxima des sels minéraux par les os.

Il est remarquable que l'activité phosphatasique est faible lorsque le squelette fixe le plus intensivement les sels phosphocalcaires. Cependant la teneur la plus élevée de l'os en phosphatase coïncide avec le moment où la pièce squelettique s'organise avec la plus grande rapidité.

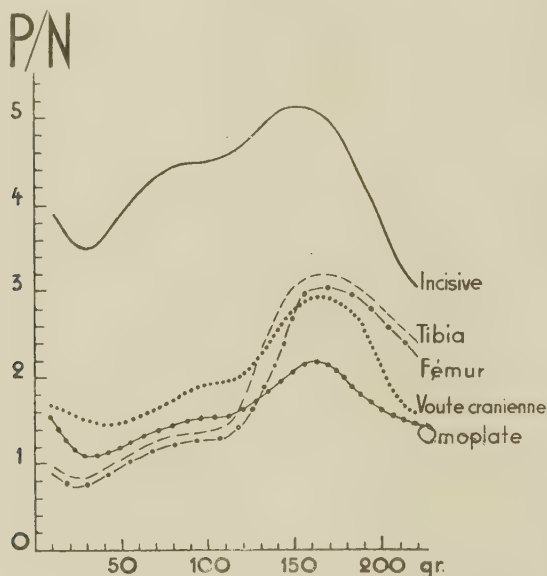


FIGURE 2. — Valeur du rapport P/N de divers os et dents chez le Rat au cours de la vie.

Abscisses : poids des animaux en grammes,

Ordonnées : rapport : P/N.

(Figure empruntée à A. ROCHE et Y. MARCELET [31]).

Il semble donc possible de penser que si la phosphatase participe aux différents processus de formation de la substance osseuse (membraneux, endochondral, haversien), elle contribue plus activement aux deux premiers qu'au dernier. En effet, chez l'animal jeune la formation de la substance osseuse relève du mécanisme membraneux ou endochondral, tandis que chez l'animal adulte c'est surtout le mécanisme haversien qui entre en jeu.

§ 2. *Ossification de réparation.* — La formation accidentelle de substance osseuse au cours de la réparation d'un os après fracture s'accompagne de phénomènes généraux analogues aux précédents.

Peu de jours après la fracture le pouvoir estérasique s'élève considérablement avant même le plus souvent qu'un cal fibreux ait eu le temps de se former, puis elle conserve sensiblement la même valeur pendant que celui-ci s'organise, et diminue pour atteindre son taux normal quand le cal s'ossifie (Pigeon), ou devient un pseudocal (Rat) (fig. 3). Le mécanisme phosphata-

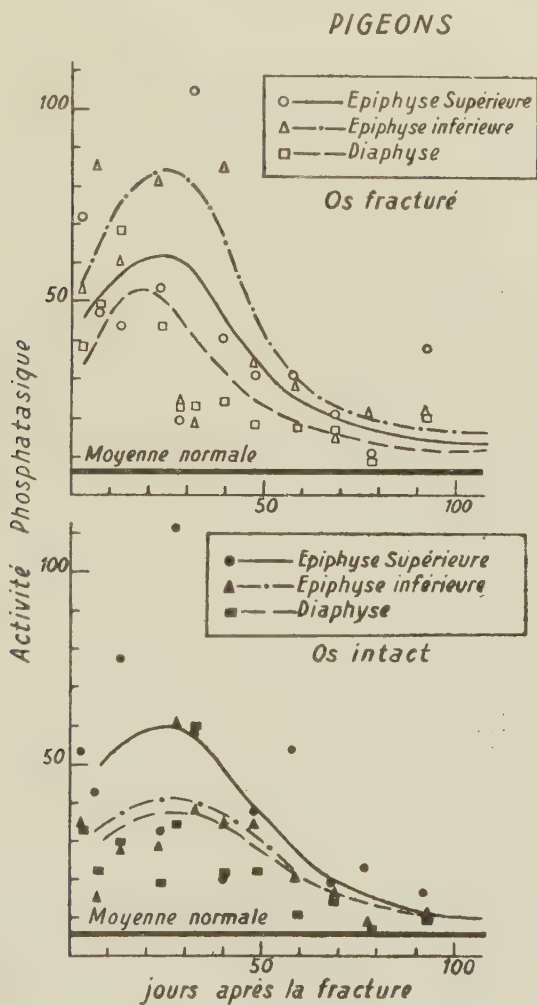


FIGURE 3. — Activité phosphatasique relative des deux humérus après fracture de l'un d'eux chez le Pigeon.

Abcisses : nombre de jours après la fracture ;
 Ordonnées : activité phosphatasique relative ;
 (d'après J. ROCHE et A. FILIPPI [38]).

tasique très rapidement mis en jeu ne présente pas un parallélisme étroit avec la réparation osseuse de la lésion. Ces faits sont à rapprocher de ceux observés au cours du développement des os embryonnaires : l'apparition de la phosphatase et son existence à un taux élevé, aussi bien dans un os en voie de réparation que dans l'ébauche protéique du squelette chez le fœtus, précèdent de beaucoup la calcification. Celle-ci devient très intense bien après que l'activité phosphatasique ait dépassé son intensité maxima.

L'augmentation du taux de l'enzyme après une fracture, existe non seulement au niveau du cal et dans les diverses régions de l'os fracturé, mais aussi dans tout le système squelettique. « Le squelette d'un animal ayant un os fracturé est tout entier le siège de processus déclenchés par l'existence et l'évolution de la lésion » (ROCHE et FILIPPI [38]).

Le synchronisme des phénomènes se produisant dans le squelette révèle la remarquable aptitude que possède celui-ci à modifier le pouvoir estérasique. Comment peuvent s'opérer ces variations ? Pour l'expliquer on a essayé d'agir sur l'activité phosphatasique soit « *in vivo* », soit « *in vitro* », à l'aide de différents stimulants : ion Mg^{++} , parathyrone.

§ 3. *Modifications expérimentales.* — Les expériences réalisées « *in vitro* » sur des macérations d'os en présence d'ions Mg^{++} à la concentration optima, montrent que l'activité phosphatasique n'est pas toujours également susceptible d'être activée [35, 40].

Le magnésium augmente considérablement l'activité enzymatique des os d'animaux adultes ; son action est beaucoup plus faible sur celle d'animaux jeunes. Il peut même inhiber l'enzyme chez des animaux en période de croissance intense.

L'explication de ces faits est la suivante : l'activation de la phosphatase par les ions Mg^{++} dépend de la concentration de ceux-ci, sans leur être proportionnelle ; l'addition progressive d'un sel de magnésium détermine une augmentation de l'activité estérasique qui atteint rapidement un maximum au delà duquel elle décroît. Dans les expériences relatées plus haut, tout se passe comme si, chez l'animal adulte, la phosphatase était susceptible d'être activée tandis que chez l'animal en pleine croissance elle avait en quelque sorte dépassé cette possibilité, subissant déjà l'action maxima d'un activateur. Ceci

explique que, chez un animal jeune le magnésium n'a sur la phosphatase qu'une action faible, ou même négative. Il semble donc que les variations du système enzymatique des os au cours de la vie sont sous la dépendance de coenzymes inhibiteurs ou activateurs. Il existe un mécanisme général de stimulation ou de ralentissement de la phosphatase.

Chez un animal sain et adulte l'injection de parathyroïde détermine une augmentation considérable de l'activité phosphatasique, qui atteint très rapidement son maximum. Ces mêmes injections n'apportent pas de changement chez un animal jeune ou fracturé. Il est probable que la parathyrone joue un rôle dans le mécanisme phosphatasique, et cela par l'intermédiaire des ions Mg^{++} . Après une fracture, la parathyroïde déclencherait, par une décharge hormonale, l'augmentation estérasique maxima. C'est pourquoi cette dernière ne peut plus alors être renforcée ni par des injections de parathyrone « *in vivo* », ni par des ions Mg^{++} « *in vitro* ».

En résumé, l'activité phosphatasique du système osseux, chez les Mammifères et les Oiseaux, ne demeure constante ni au cours de la croissance, ni au cours des phénomènes pathologiques. Elle relève d'un mécanisme général sous la dépendance de co-enzymes et participe à tous les processus de l'ossification, plus particulièrement pendant la première étape de la formation du squelette.

Nous avons intentionnellement limité cet exposé au rôle de la phosphatase dans l'ossification chez les Vertèbres, mais il semble que cet enzyme participe également aux processus de calcification chez de nombreux Invertébrés, bien que le sel de calcium de la carapace ou de la coquille de ceux-ci soit principalement constitué par du carbonate de calcium. Comme l'ont signalé PRENANT, DRACH, MANIGAULT, les formations calcifiées des Crustacés et de nombreux Mollusques contiennent de petites quantités de phosphate tricalcique et il y a tout lieu de se demander si celles-ci ne constituent pas des « amorces » de précipitation pour le carbonate de calcium. En fait MANIGAULT [17] a établi que la genèse de la coquille de nombreux Mollusques comporte la mise en jeu d'une importante activité phosphatasique des organes l'élaborant. Par ailleurs des expériences encore inédites poursuivies par le Professeur J. ROCHE et Mlles BULLINGER, LAURENS et de LAROMIGUIÈRES, ont démontré qu'il en est de même dans le dé-

veloppement de la carapace et son renouvellement par la mue chez les Crustacées.

C. — Notions générales sur les problèmes biochimiques posés par l'ossification dans la classe des Poissons.

Les questions concernant le rôle de la phosphatase dans l'ossification n'ont été étudiées que sur les Oiseaux et les Mammifères. Il est intéressant de se demander si le rôle de cet enzyme est analogue chez les Poissons. L'étude de l'activité phosphatasique du squelette de ceux-ci doit permettre d'envisager d'une part des problèmes concernant cette classe d'animaux, et, d'autre part, diverses questions de biochimie générale et comparée.

L'intérêt particulier que présentent les Poissons réside dans le fait qu'ils constituent une classe à la base de l'embranchement des Vertébrés (1). Les travaux des embryologistes et des anatomistes permettent d'établir que tous les Tétrapodes (Batraciens, Reptiles, Oiseaux, Mammifères) dérivent des Gnathostomes, comme la plupart des Poissons, et qu'en outre ces derniers sont parfois les ancêtres des premiers. Ainsi, pour n'en donner qu'un exemple, les Batraciens Urodèles dérivent des Dipneustes (sous-classe des Poissons osseux).

Cet examen d'ensemble des Vertébrés permet de supposer que les différents stades de l'évolution du système osseux existent chez les Poissons. C'est en effet ce que l'on observe. D'une façon générale, les Poissons comportent un endosquelette correspondant au système osseux des vertébrés supérieurs et un exosquelette parfois très développé (écailles).

L'exo- et l'endosquelette sont constitués par des os cartilagineux permanents, ou des os membraneux typiques, ou encore par des os à ébauche cartilagineuse, terme de passage entre les deux précédents. Enfin il est possible de trouver chez le même animal tous les degrés d'évolution d'un même os.

Les Poissons forment une classe très hétérogène divisée en deux sous-classes : les Poissons cartilagineux et les Poissons osseux.

(1) Il convient toutefois de signaler que l'on tend à séparer les Cyclostomes des Poissons en une classe particulière d'animaux à la base de l'embranchement des Vertébrés (voir p. 57).

TABLEAU IV.

CLASSE DES POISSONS

I. <i>Poissons cartilagineux</i> : masses chondroïdes à re- vêtement calcaire	{	1. <i>Cyclostomes</i>	Lamproies.
		2. <i>Elasmo- branches</i>	Holocéphales . Chimères.
			Sélaciens..... Squales, Raies.
			Batidés Raies, Torpilles.
II. <i>Poissons osseux</i> : ébauche cartilagineuse provisoire — os de membrane.	{	1. <i>Dipneustes</i> ..	Cératodus.
		2. <i>Ganoïdes</i>	Esturgeons.
		3. <i>Téléostéens</i>	Soles, Sardines, etc.

Chez les premiers, l'endosquelette est représenté par des couches calcaires englobant des masses chondroïdes.

Les Poissons cartilagineux comprennent deux ordres : Les *Cyclostomes* (type Lamproie) qui présentent des particularités anatomiques fort différentes des autres Poissons, et les *Elasmo-branches* très archaïques, au squelette entièrement cartilagineux. Ceux-ci se subdivisent en Holocéphales, Batidés, Sélaciens. Les Sélaciens, groupe le plus important des Elasmobranches, englobent l'ensemble des Requins ou Squales ; quant aux Batidés ils comprennent entre autres les Raies et les Torpilles.

Chez les Poissons osseux le squelette est formé soit par des os de membrane typiques, soit par des os à ébauche cartilagineuse provisoire. On les subdivise en trois sous-ordres : Dipneustes, Ganoïdes, Téléostéens, dont dérivent plus de 90 p. 100 de la faune ichtyologique actuelle.

Ces données d'ensemble sur les Poissons permettent de comprendre quel riche matériel d'étude leur squelette offre au biochimiste. Il suffit pour s'en rendre compte de faire les remarques suivantes : On rencontre chez les Poissons des os de types très divers : os de membrane, os à ébauche cartilagineuse provisoire (Téléostéens) os cartilagineux permanents pouvant présenter un revêtement osseux (Sélaciens), os dermiques, comme les écailles placoides des Sélaciens dont l'évolution et la constitution sont comparables à celles des dents, ou encore, comme les écailles des Téléostéens qui sont des os de membrane typiques. Certains Poissons présentent à la fois des zones de calcification et des zones demeurant cartilagineuses (Boucles des Raies).

Par ailleurs on peut rencontrer chez un même poisson des os ou des dents qui sont à des étapes successives de leur évolution. Ce phénomène exceptionnel existe chez les Requins dont la cavité buccale est tapissée de plusieurs rangées de dents (présentant de l'intérieur vers l'extérieur des degrés de croissance de plus en plus poussée) qui viennent progressivement remplacer les plus anciennes. Enfin les Poissons offrent une grande diversité de dents : d'une part des dents vraies, de types anatomiques multiples, chez les Sélaciens et Téléostéens, d'autre part des dents cornées chez les Cyclostomes.

La croissance osseuse des Poissons affecte un rythme particulier. Elle n'est pas continue comme chez les Mammifères et les Oiseaux, mais périodique. En outre certaines espèces possèdent des os dermiques, tandis que d'autres en sont dépourvues.

D. — Objet du travail.

Le but de ce travail est de rassembler les documents existant à l'heure actuelle et ceux que nous avons pu établir en un exposé d'ensemble sur la participation d'une phosphatase à l'ossification chez les Poissons et sur l'intérêt de cet enzyme au regard de la biochimie générale et de la biochimie comparée.

Notre étude comprend donc deux parties :

1° Il nous a semblé essentiel d'exposer d'abord les données relatives à l'existence et aux caractères de l'estérase des organes osseux des Poissons, afin de la comparer à ceux de la phosphatase étudiée chez les Oiseaux et les Mammifères.

Nous avons déterminé ensuite la localisation de cet enzyme dans l'endosquelette et l'exosquelette des Poissons osseux ou cartilagineux.

Les données rassemblées à cet effet concernent les os des Téléostéens et les parties cartilagineuses ou calcifiées du squelette des Sélaciens, ainsi que les dents cornées des Cyclostomes.

2° Après ce travail d'identification et de localisation nous avons abordé la question des modifications de la teneur en phosphatase du tissu osseux chez les Poissons.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, la croissance des Oi-

seaux et des Mammifères est continue et l'activité phosphatasique suit chez eux une courbe régulière ; très importante chez l'animal jeune, cette activité décroît ensuite progressivement. Pour les Téléostéens, au contraire, le développement est périodique et évolue par étapes saisonnières. L'activité phosphatasique, de son côté, variera-t-elle avec l'âge ou avec la saison, ou bien encore par suite de la superposition de ces deux influences ?

On verra plus bas quelles questions particulières posent à cet égard les expériences poursuivies sur chaque organe : écailles, dents, os somatiques.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Studies on the phosphatases. The influence of some electrolytes on the phosphatases of animal tissues. Phosphatases of the liver, kidney, serum and bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 517-527.
2. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Researches on the phosphatases. III. On the mechanism of inactivating action of sodium oxalate and of phosphates on the « alkaline » phosphatases of animal tissues. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1491-1507.
3. BODANSKY (O.). — The accelerant effect of α -aminoacids on the activity of bone phosphatase. *The Journ. of biol. Chem.*, 1936, **114**, 273-288.
4. BODANSKY (O.) and BAKWIN (H.). — Effect of parathormone on bone phosphatase activity in vitro. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1933, **31**, 64-65.
5. BOGERT (J.) and BAIRD-HASTINGS. — The calcium salts of bones. *The Journ. of biol. Chem.*, 1931-1932, **94**, 473-481.
6. ERDTMAN (H.). — Ueber Niererphosphatase und ihre Aktivierung. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1928, **177**, 211.
7. CATTANEO (C.), GABBRIELLI (M. C.) e SCOZ (G.). — Fosfatasi alcalina e attivazione in presenza di sali di magnesio. Relazione tra concentrazione dell'enzima, attività fosfatasica e tempo. *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, 1937, **12**, 37.
8. FELL (H. B.) and ROBISON (R.). — The development and phosphatase activity in vivo and in vitro of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1905-1921.
9. FELL (H. B.) and ROBISON (R.). — The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochem. J.*, 1929, **23**, 767-784.
10. FOLLEY (S. J.) and KAY (H. D.). — The phosphatases. *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 1 vol., 378 p., Akad. Verlagsges. M. B. H. ed., Leipzig, pp. 159-212. (Revue d'ensemble).

11. JENNER (H. D.) and KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. III. Magnesium and the phosphatase system. *The Journ. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 733-748.
12. GYÖRGY (P.) und FREUDENBERG (E.), cité d'après [27].
13. HOLT (L.), LA MER (V.) et CHOWN (B.). — Delayed equilibrium between the calcium phosphates and its biological significance. *The Journ. of biol. Chem.*, 1926, **64**, 567-578.
14. HOLT (L.), LA MER (V.) et CHOWN (B.). — Studies of calcification. I. The solubility product of secondary and tertiary calcium phosphate under various conditions. *The Journ. of biol. Chem.*, 1925, **646**, 509-564.
15. LOGAN (M. A.) and TAYLOR (H. L.). — The formation and chemical nature of bone salt. *The Journ. of biol. Chem.*, 1937, **119**, 293-307.
16. Mac FARLANE (M. G.), PATTERSON (L. B. M.) and ROBISON (R.). — The phosphatase activity of animal tissues *Biochem. J.*, 1934, **28**, 720-724.
17. MANIGAULT (P.). — Recherches sur le calcaire chez les Mollusques. Phosphatase et précipitation calcique. *Histochimie du calcium. Ann. Inst. Océanogr.*, 1939, **18**, 331-426.
18. MARTLAND (M.) and ROBISON (R.). — The preparation and use of the bone phosphatase. *Biochem. J.*, 1929, **23**, 237-242. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 1927, **21**, 665-674.
19. PLIMMER. — *Biochem. J.*, 1913, **7**, 43, cité d'après [10].
20. NIVEN (J. F. S.) and ROBISON (R.). — The development of the calcifying mechanism in the long bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2237-2242.
21. POLICARD (A.). — A propos des mécanismes de la croissance osseuse. *Press. med.*, 1930, n° 21, du 12 mars 1930.
22. POLICARD (A.) et LERICHE (R.). — Position actuelle du problème de l'ostéogénèse. *Press. med.*, 1934, n° 9.
23. POLICARD (A.), PÉHU (M.), ROCHE (J.) et BOUCAUMONT. — Répartition histologique de la phosphatase dans la zone d'ossification des os longs chez l'enfant normal et rachitique. *Bull. Histol. appl.*, 1931, **8**, 171-175.
24. POLICARD (A.) et ROCHE (J.). — La formation de la substance osseuse. Essai de coordination des données histologiques et biochimiques. *Arch. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1937, **13**, 645-703.
25. ROBISON (R.). — The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 1923, **17**, 286-293.
26. ROBISON (R.). — Bone phosphatase. *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 1 vol. 375 p. Akad. Verlagsges. M. B. H. ed., Leipzig, 1932, pp. 280-294.
27. ROBISON (R.). — The significance of phosphoric esters in metabolism. 1 vol., 104 p., New-York Univ. Press ed., 1932.
28. ROBISON (R.) and ROSENHEIM (H. A.). — Calcification of hypertrophic cartilage in vitro. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 684-698.
29. ROBISON (R.) and SIVEN (G. F. S.). — The development of calcifying mechanism in the long bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2237-2242.

30. ROCHE (A.) et GARCIA (I.). — Recherches sur l'ossification. I. Ossification normale et constitution de réserves minérales dans les os au cours du développement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 1014-1026.
 31. ROCHE (A.), ROCHE (J.) et MARCELET (Y.). — Recherches sur l'ossification. IV. Ossification des os plats, étapes du développement du squelette et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 705-717.
 32. ROCHE (J.). — Quelques aspects biochimiques de l'ossification. *Ann. et Bull. Soc. Roy. Sc. med. et nat. Bruxelles*, 1937, n^{os} 3-4, 23-47.
 33. ROCHE (J.). — Blood phosphatases. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1724-1733.
 34. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Sur le système phosphatasique des hématies. *Enzymolog.*, 1939, **7**, 278-291.
 35. ROCHE (J.) et LÉANDRI (A.). — Etude quantitative de la phosphatase des os longs au cours de la croissance du Rat. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 1141.
 36. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur la spécificité des phosphoestérases. Contribution à l'étude des phosphomonoestérases du foie et du rein. *Enzymolog.*, 1937, **3**, 75-81.
 37. ROCHE (J.) et MOURGUE (M.). — Action comparée de l'hormone parathyroïdienne et de la vitamine D sur la consolidation des fractures osseuses expérimentales. *C. R. Soc. biol.*, 1939, **130**, 1134.
 38. ROCHE (J.) et FILIPPI (A.). — Augmentation de l'activité phosphatasique du squelette après fracture d'un os et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 1147-1165.
 39. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et MOURGUE (M.). — Sur les réactions générales du système osseux. *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **207**, 254.
 40. SCOZ (G.) e MARANGONI (P. L.). — Variazioni del potere fosfatase del sangue e dell'osso e del processo di ossificazione in rapporto con la velocità di accrescimento normale e sperimentalmente modificata. *Arch. Sc. biol.*, 1936, **22**, 43-65.
 41. SHEAR (J.), WASHBURN and KRAMER (B.). — Composition of bone. *The Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 697.
 42. SHEAR (M.) et KRAMER (B.). — Composition of bones ; Physico-chemical mechanism. *The Journ. of biol. Chem.*, 1928, **79**, 125-143.
 43. SUSUKI, YOSHIMURA et TAKAHASHI. — *Imp. Univ. coll. Agric. Bull., Tokio*, 1907, **7**, 503, cité d'après [10].
-

CHAPITRE II.

Existence, caractères et localisation d'une phosphatase dans les divers organes osseux des Poissons et rapports existant entre la localisation de l'enzyme et la calcification.

A la suite des importants travaux de ROBISON sur le squelette des Mammifères et des Oiseaux, BODANSKY, R. M. et H. BAKWIN [2] cherchèrent à étendre les conclusions de cet auteur à la classe des Poissons.

La complexité de la structure et la variété de la formation du tissu osseux chez ces animaux, particulièrement bien étudiées par PORTIER et FONTAINE [7], PRENANT [9], STÉPHAN [20], ne permettent pas *à priori* d'attribuer à ceux-ci le mécanisme phosphatasique d'enrichissement en ions $\text{PO}_4^=$ existant au niveau des organes osseux des Vertébrés supérieurs. Par ailleurs, les particularités caractérisant la structure des os des Poissons en font précisément l'intérêt, du point de vue de la biochimie générale et comparée de l'ossification.

BODANSKY, R. M. et H. BAKWIN, se basant sur des recherches d'ordre purement qualitatif, conclurent que « la phosphatase existe dans le squelette cartilagineux des Sélaciens aussi bien que dans le squelette osseux ou dentinoïde des Téléostéens. » (loc. cit. p. 560 [2]). Cependant, en dehors de ces intéressants résultats, il n'existait pas de données sur les caractères de la phosphatase du système osseux des Poissons, ni sur sa participation éventuelle à la formation des os chez ces animaux. Nous exposons ici, avec l'autorisation de Monsieur le Professeur J. ROCHE, les recherches qu'il a effectuées avec E. BULLIN-

GER, et celles qu'il a bien voulu nous confier. Ce chapitre réunit les résultats obtenus dans les domaines suivants :

1° L'étude de l'estérase des différents organes osseux (vertèbres, écailles, dents) des Poissons aussi bien osseux que cartilagineux, poursuivie afin de comparer le système phosphatique de ces animaux à celui des Vertébrés supérieurs.

2° La localisation de la phosphatase dans les diverses pièces squelettiques, et les rapports existant entre la présence de l'enzyme et la calcification chez les Téléostéens, les Séla-ciens ou les Cyclostomes.

L'étude du second de ces problèmes devait permettre d'apporter une contribution à la biochimie comparée des Poissons.

A. — Caractères de l'enzyme.

Les recherches poursuivies en vue d'établir les caractères de la phosphatase ont été effectuées soit par J. ROCHE et E. BULLINGER sur des poissons de l'Atlantique, soit par moi-même sur des animaux pêchés en Méditerranée.

Dans le premier cas, les Poissons pêchés en juillet-août au large de Concarneau et ayant servi de matériel d'étude sont principalement : un Poisson osseux, la Vieille [*Labrus berggylta*, (Ascianus)], deux Poissons cartilagineux, à savoir : le Requin-peau-bleue [*Carcharias glaucus* (L.)] et la Lamie long nez [*Isurus conubicus* (Gmel)]. De notre côté, nous avons opéré aux différentes époques de l'année sur un Téléostéen de la Méditerranée, la Sardine [*Clupea pilchardus*, (Walb.)], dont les individus adultes mesurent de 12 à 15 cm. de long et dont les alevins ont en mars-avril une longueur de 2 à 4 cm.

Ainsi qu'il a été mentionné dans le chapitre précédent, il existe un assez grand nombre de phosphatases que FOLLEY et KAY [3] se sont efforcés de classer. Selon ces auteurs l'enzyme de l'os est une phosphomonoestérase du type A₁ qui se différencie des autres par trois caractères :

1° le pH optimum d'action,

2° l'action préférentielle sur les β - et non sur les α -glycérophosphates,

3° la sensibilité à la présence d'ion Mg⁺⁺,

1. pH optimum d'action.

§ 1. Les essais, permettant de déterminer le pH optimum d'action de l'enzyme, ont été effectués sur l'extrait obtenu par filtration sur coton de verre d'une macération d'organes osseux broyés et laissés en contact avec de l'eau chloroformée, à 0° pendant 2 à 10 jours. Le pH optimum a été établi de la manière suivante : Dans une série de 10 tubes à essai nous avons placé : 2 cm³ de macération d'organes, 1 cm³ de solution à 5,08 p. 100 de β glycérophosphate de sodium pur, 3 cm³ d'eau distillée additionnée de ClH ou NaOH, de façon à réaliser une échelle de pH allant de 3,5 à 10. Ces tubes, saturés de chloroforme pour éviter une hydrolyse bactérienne du substrat, sont placés à l'étuve à 37° pendant 14 à 24 heures. Ce temps écoulé, le dosage des ions PO₄⁼ libérés permet d'évaluer l'hydrolyse du glycérophosphate aux différents pH.

Les ions phosphoriques sont dosés par la méthode de BRIGGS, modifiée par ROBISON, l'intensité de coloration des milieux étant mesurée non au colorimètre mais au photomètre de PULFRICH.

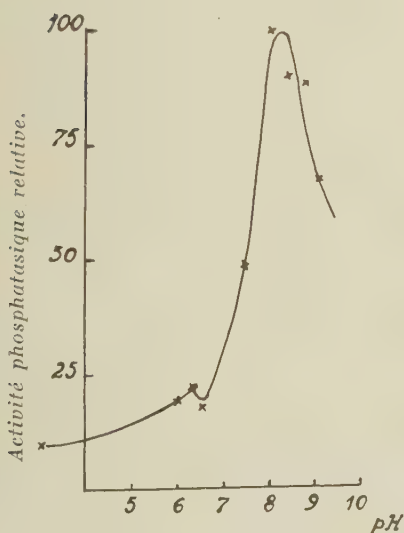


FIGURE 4.

FIGURE 4. — Activité phosphatasique relative de macération de vertèbres de *Sardine* adulte.

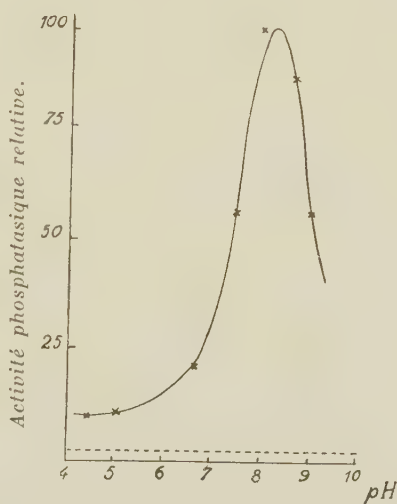


FIGURE 5.

FIGURE 5. — Activité phosphatasique relative de macération de rachis d'alevins de *Sardine* à divers pH.

Abscisses : pH.

Ordonnées : Activité phosphatasique relative.

Les mesures du pH, effectuées à l'électrode du verre avant et après le passage à l'étuve, permettent de se rendre compte que, dans les conditions décrites plus haut, le pH ne varie pas d'une manière considérable au cours de l'hydrolyse des glycérophosphates.

§ 2. Le pH optimum de la phosphomonoestérase des os des Poissons a été étudié selon la méthode décrite ci-dessus, sur une espèce de la Méditerranée, (*Clupea pilchardus* Walb.) récoltée en novembre-décembre. Nous avons opéré sur une macération de vertèbres de Sardines abandonnée 4 jours à la glacière, et dosée après 14 heures d'étuve. Les résultats obtenus (1) sont représentés sur le graphique de la figure 4.

En mars-avril, la courbe de l'activité phosphatasique en fonction du pH, effectuée sur des alevins de Sardine (figure 5), présente une allure générale comparable, avec un optimum à pH = 8,25-8,50. Toutefois il est possible qu'il existe en outre dans les os des alevins une petite quantité de phosphomonoestérase A₂, à pH optimum de 6 environ.

§ 3. Enfin, en juin-juillet le Professeur ROCHE et E. BULLINGER [17] ont effectué une série d'expériences du même ordre sur l'exo- et l'endosquelette de deux Sélaciens : vertèbres d'*Isurus cornubicus* (Gmel.), de *Carcharias glaucus* (L.), et sur l'exosquelette d'un Téléostéen : écailles de *Labrus berggylta* (Ascan.). L'activité phosphatasique relative de tous ces organes présente un maximum à pH = 8,5-9,0.

Les os de tous les Téléostéens étudiés contiennent donc une phosphoestérase de même pH optimum d'action, soit 8,5-9,0.

2. — Action sur les α et β glycérophosphates.

§ 1. Un deuxième type d'expérience permet de déterminer l'activité relative de la phosphatase sur les α - et β - glycérophosphates. A cet effet on réalise une série d'échantillons préparés de la manière décrite plus haut, à ceci près qu'on les répartit en deux lots contenant l'un du β - glycérophosphate, l'autre de l' α -, chaque lot s'échelonnant sur une même gamme de pH environnant le pH optimum. Après 12 à 24 heures de

(1) L'activation relative reportée sur les graphiques a été calculée à partir des résultats expérimentaux, en donnant la valeur 100 à l'activation maxima obtenue.

séjour à l'étuve à 37°, les ions physiologiques libérés sont dosés, ce qui permet de déterminer l'activité hydrolysante relative de l'enzyme sur les isomères α et β du glycérophosphate de sodium.

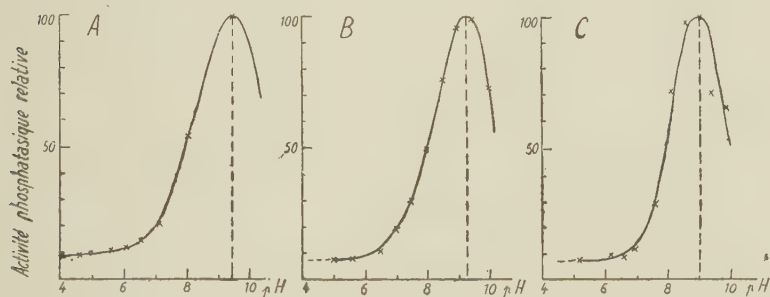


FIGURE 6. — Activité phosphatasique relative de macération d'organes osseux de Poissons à divers pH : A vertèbres d'*Isurus cornubicus* ; B, dents de *Carcharias glaucus* ; C, écailles de *Labrus berggylta*.

Abscisses : pH.

Ordonnées : Activité phosphatasique relative.

(Figure empruntée à J. ROCHE et E. BULLINGER [17]).

§ 2. A partir d'une macération de vertèbres de Sardines pêchées en Méditerranée au cours d'avril-mai, nous avons établi une série d'échantillons de macération « encadrant » le pH optimum et dont l'activité est la suivante :

TABEAU IV.

Activité phosphatasique relative d'une macération de vertèbres de Sardine sur les glycérophosphates de sodium α et β à divers pH.

pH	Isomère	
	α	β
6,0	36	—
6,4	36	70
6,6	31	60
7,0	15	52
7,3	45	90
8,0	57	93
8,4	64	99
8,6	70	—
8,7	70	129
9,2	57	93

§ 3. L'activité relative de la phosphatase sur les α - et β -glycérophosphates a été dosée sur différentes pièces squelettiques

de diverses espèces appartenant aux ordres des Poissons osseux et cartilagineux.

Ces recherches ont été faites uniquement au pH optimum ; elles montrent toutes que l'action de la phosphatase existant dans les verèbres, les dents et les écailles des Sélaciens et Téléostéens est plus forte sur les β - que sur les α -glycérophosphates (J. ROCHE et E. BULLINGER).

TABLEAU V.

Activité relative de la phosphatase de divers organes de Poissons sur les α et β glycérophosphates de sodium.

Activité relative sur l'isomère	Macération de		
	Vertèbres d' <i>Isurus</i>	Dent de <i>Carcharias</i>	Ecaillés de <i>Labrus</i>
α	76,6	83,6	72,0
β	100	100	100

3. — Activation par les ions Mg^{++} .

§ 1. L'activation par des ions Mg^{++} a été étudiée sur des macérations dialysées à 0° contre de l'eau distillée pendant 18 à 24 heures. Nous avons recherché, en nous plaçant au pH optimum d'action, (qui n'est pas modifié par le magnésium) si l'activité enzymatique variait par l'apport d'ions Mg^{++} dans le milieu, et s'il y avait un rapport entre la concentration en ions Mg^{++} et l'activation par celui-ci. A cet effet l'expérience a été conduite de la manière suivante : dans huit tubes à essai il a été mis respectivement 2 cm³ d'extrait d'organe, une solution de β glycérophosphate apportant 5 mg. de phosphore et de l'eau distillée en quantité suffisante pour obtenir dans chaque tube un volume total de 6 cm³, les ions Mg^{++} étant apportés par une solution de sulfate de magnésium répartie dans les 8 tubes de manière à réaliser une échelle allant de $\frac{M}{10}$ à $\frac{M}{100.000}$ en concentration des ions Mg^{++} dans le milieu. Ces mélanges ont séjournés dans l'étuve à 37° pendant un laps de temps de 18 à 24 heures. Les ions phosphoriques libérés, dosés par la méthode de BRIGGS, permettent de mesurer l'activité relative de l'enzyme.

§ 2. Nous avons réuni dans la figure ci-dessous (figure 7) les courbes représentant l'activation enzymatique relative de l'enzyme en fonction de la concentration en ions Mg^{++} des

milieux. Cette dernière a été exprimée, selon la notation proposée par JENNER et KAY [4] en unités q Mg, q Mg = — $\log$ [Mg], la concentration en magnésium [Mg], étant le nombre de molécules-gramme de sel magnésien par litre de solution.

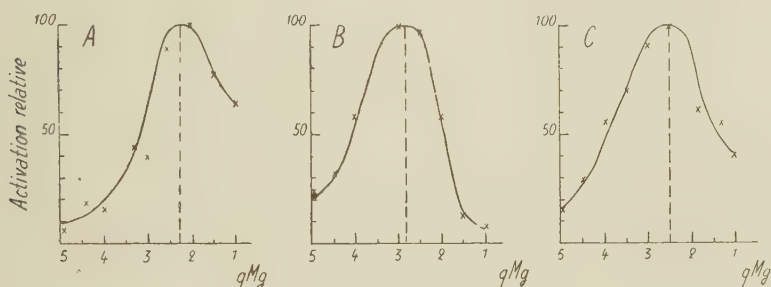


FIGURE 7. — Activation relative par les ions Mg^{++} à pH = 9,0, de phosphatase d'organes osseux de Poissons = A, vertèbres d'*Isurus Cornubicus* ; B, dents de *Carcharias glaucus* ; C, écailles de *Labrus Berggylta*.

Abscisses : q Mg ;

Ordonnées : activation relative.

(Figure empruntée à J. ROCHE et E. BULLINGER [17]).

Les expériences ont été réalisées sur les vertèbres d'*Isurus cornubicus* (Gmel.) les dents de *Carcharias glaucus* (L.), les écailles de *Labrus berggylta* (Ascan.) par M. le Professeur J. ROCHE et E. BULLINGER auxquels nous empruntons la fig. 7.

§ 3. La même étude renouvelée sur des os de Sardines de 11 cm. pêchées en Méditerranée en novembre-décembre, a été faite à partir de l'extrait aqueux obtenu par simple filtration sur coton de verre d'une macération de vertèbres broyées, abandonnées dans l'eau chloroformée à 0° pendant 4 jours.

La même technique employée sur une macération de rachis d'alevins récoltés en avril a montré que l'enzyme était susceptible d'une activation avec un maximum pour une concentration en magnésium correspondant à q Mg = 2,5.

TABEAU VII.

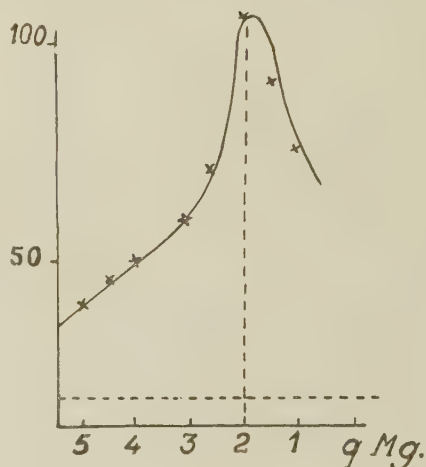
Activité phosphatasique relative de rachis d'Alevins en fonction des concentrations en magnésium du milieu.

Log. de la concentration en Mg^{++} . q Mg = ...	1	2	2,5	3	4	4,5	5	5,5	0
Activité phosphatasique.	168	189	189	189	168	147	147	133	133

Toutefois cette activation est relativement beaucoup moindre que celle obtenue sur les macérations de vertèbres d'animaux adultes. J. ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [15] ont antérieurement observé que, chez le Rat en croissance les os ont une activité phosphatasique plus grande que chez le Rat adulte. Par ailleurs, l'addition d'ions Mg^{++} aux macérations aqueuses des os d'animaux jeunes ne provoque qu'une activation minime, tandis que ces ions activent fortement l'enzyme des animaux adultes. Dans un cas comme dans l'autre, tout se passe donc comme si le système phosphatasique des os en croissance était à peu près à son maximum d'activation physiologique, tandis que chez l'adulte le pouvoir phosphatasique est faible faute d'activateurs. Ce fait explique d'ailleurs comment il est possible que l'activité phosphatasique puisse alors facilement être accrue sous des influences diverses (fracture, parathormone, etc.). A cet égard les os des Mammifères et ceux des Poissons ont un comportement identique.

FIGURE 8. — Activation relative par les ions Mg^{++} à pH = 9,0, de la phosphomonoestérase des vertèbres de *Clupea pilchardus* Walb.

Abscisses : q Mg.
Ordonnées : activation relative.



Il découle de ces faits que la phosphatase des différents organes osseux des Poissons (osseux et cartilagineux) est identique à la phosphomonoestérase du type A_1 de la classification de FOLLEY et KAY, existant chez les Vertébrés supérieurs.

En effet l'estérase des Poissons a une action optimum à pH = 8,5-9, une activité plus intense sur les β - que sur les α -glycérophosphates ; enfin elle est activée par la présence d'ions Mg^{++} (maximum pour q Mg. = 2-3).

B. — Répartition de la phosphatase dans les divers organes osseux et les téguments des Poissons de divers ordres.

Les Poissons permettent, grâce à la variété de structure de leurs tissus osseux, d'étudier un grand nombre de problèmes dont nous avons déjà indiqué les principaux. Ils offrent un matériel d'étude varié : organes exclusivement osseux ou cartilagineux, ou mixtes ; endo et exosquelette ; enfin, dents très particulières du fait de leur renouvellement constant suivant des modalités propres à chaque espèce.

Après avoir établi les caractères de la phosphatase dans la classe des Poissons, il y avait lieu d'en étudier la répartition dans les différents organes osseux et dans les téguments de ces animaux. A cet effet, l'activité phosphatasique d'une part et d'autre part le rapport : P/N, rendant compte du degré de calcification des os (A. ROCHE et L. GARCIA [13]) ont été déterminés sur diverses pièces squelettiques. L'activité phosphatasique a été mesurée par la méthode de ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [15], dont voici la description sommaire :

PRINCIPE. — On fait agir un fragment d'os sur du β -glycérophosphate de sodium à un pH, une température, et pendant un temps dont les optima ont été déterminés par des expériences antérieures. La quantité d'ester hydrolysée dans les conditions choisies peut être considérée comme proportionnelle à la teneur en phosphatase du tissu.

Le dosage de l'azote du fragment osseux étudié permet de rapporter l'activité enzymatique à 100 mg. d'azote protéique du stroma organique de la pièce squelettique.

MODE OPÉRATOIRE. — Cette méthode a été mise en œuvre en faisant agir un fragment d'os (80 à 100 mg.) pendant 18 heures à 37° sur 12 cm³ d'une solution à 1,016 p. 100 de β glycérophosphate de sodium pur (O. BAILLY) additionné de 0,02 cm³ de soude N/5 pr pH = 9,0.

Les phosphates libérés sont dosés par la méthode de BRIGGS-ROBISON (mesure colorimétrique au photomètre de PULFRICH) et l'azote constituant spécifique du support protéique, est dosé par microkjeldahl.

L'activité phosphatasique A est fournie par la formule :

$$A = \frac{\text{mg. P libéré}}{\text{mg N contenu dans le frag. os}} \times 100$$

Cette méthode présente l'avantage d'éliminer l'erreur due aux différences de calcification des os, en rapportant le pouvoir estérasique d'un fragment d'organe à son stroma protéique.

Le degré de calcification du tissu est évalué par le rapport : teneur en phosphore/teneur en azote (P/N). Après minéralisation dans l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur approprié (mélange catalyseur de DUMAZERT et MARCELET au sélénite de mercure), le phosphore est dosé par la méthode de NEUMANN et l'azote par microkjeldahl.

A l'aide de ces méthodes, l'activité phosphatasique et le degré de calcification ont été déterminés dans :

- 1° les différentes pièces squelettiques des Téléostéens ;
- 2° les régions osseuses et cartilagineuses des Sélaciens ;
- 3° la peau et les écailles des diverses espèces de Poissons offrant un dermosquelette plus ou moins fortement développé ;
- 4° les dents osseuses ou cornées des Téléostéens, des Sélaciens et des Cyclostomes.

1. — *Localisation dans les os des Téléostéens.*

L'endosquelette des Téléostéens, correspondant au système osseux des Mammifères, est formé soit par des os de membrane, soit par des pièces à ébauche cartilagineuse. Les particularités des Poissons osseux, qui ont servi de matériel d'étude, sont exposées dans le tableau VII.

TABLEAU VII.

Données sur les Poissons osseux ayant servi de matériel d'étude.

Nom scientifique	Nom usuel	N°	Taille	Particularités propres au système osseux de chaque espèce
A. — POISSONS DE L'ATLANTIQUE.				
<i>Arnaglossus laterna</i> (Artedi)...	Pleuronecte	I	25 cm.	Ecailles peu abondantes et de petite taille.
—	—	II	22 cm.	—
<i>Conger vulgaris</i> Cuvier	Congre	I	40 cm.	Peau dépourvue d'écailles, dents soudées au maxillaire.
—	—	II	30 cm.	—
—	—	III	30 cm.	—
—	—	IV	30 cm.	—
—	—	V	40 cm.	—
<i>Labrus berggylta</i> (Ascanius)...	Vieille	I	17 cm.	Revêtement épais de fortes écailles; dents en alvéoles, isolables.
—	—	II	20 cm.	—
<i>Lophius piscatorius</i> (L.).....	Baudroie	I	32 cm.	Ecailles rares, difficiles à isoler de la peau. Dents soudées au maxillaire.
<i>Merluccius merluccius</i> (L.).....	Merlu	I	30 cm.	Ecailles petites et peu dures. Dents soudées au maxillaire.
<i>Microchirus variegatus</i> (Donovan)...	Soléidé	I	16 cm.	Revêtement épais de fortes écailles.
—	—	II	16 cm.	—
<i>Trigla gurnardus</i> (L.).....	Grondin	I	26 cm.	Ossature très développée, écailles petites et dures, dents soudées au maxillaire.
—	—	II	28 cm.	—

B. — POISSONS DE LA MÉDITERRANÉE.

<i>Clupea pilchardus</i> Walb.	Sardine	I	7 cm.	Ecailles moyennes à poussées saisonnières importantes.
—	—	II	8 cm.	—
—	—	III	10 cm.	—
—	—	IV	12,5 cm.	—

TABLEAU VIII.

Activité phosphatasique relative, teneur en phosphore (P) et en azote (N) p. 100 du poids frais et rapport : P/N des os, des dents, et du muscle de POISSONS OSSEUX.

Animal	Organe ou tissu	Activité phosphatasique	P p. 100	N p. 100	P/N
<i>Labrus berggylta</i> I.....	Vertèbres	15,4	3,24	2,54	1,27
— II.....	—	20,8	5,59	2,26	2,48
<i>Microchirus variegatus</i> I....	—	15,8	8,65	2,78	3,12
<i>Clupea pilchardus</i> I.....	—	44			
— II.....	—	17,5			
— III.....	—	9			
— IV.....	—	26,7			
— I.....	Voûte crânienne	42			
— II.....	—	19,9			
— III.....	—	28,8			
— IV.....	—	34			
<i>Arnoglossus laterna</i> I.....	Os palatin	23,4	10,20	2,57	3,96
— II.....	—	17,6	8,78	2,77	3,18
<i>Conger vulgaris</i> I.....	Machoire inf. (sans dents)	7,3	6,87	3,87	1,77
— II.....	—	15,0	6,24	3,82	1,63
— III.....	—	2,7	6,21	3,92	1,59
— IV.....	—	3,4	6,89	4,41	1,56
— V.....	—	5,6	6,68	4,14	1,62
<i>Lophius piscatorius</i> I.....	—	7,8	2,82	2,17	1,30
<i>Merluccius merluccius</i> I.....	—	10,3	4,23	2,24	1,89
<i>Trigla gurnardus</i> I.....	Machoire inf. (avec dents)	100,2	5,33	3,05	1,74
— II.....	—	41,3	7,23	3,39	2,13
<i>Conger vulgaris</i> I.....	Dents	20,5	7,02	4,17	1,68
— II.....	—	52,0	8,90	3,88	2,29
— III.....	—	31,1	10,74	5,92	1,98
— IV.....	—	31,5	8,96	5,54	1,64
— V.....	—	23,4	7,67	4,88	1,57
<i>Labrus berggylta</i> I.....	—	85,8	12,30	3,78	3,25
— II.....	—	45,0	8,25	3,51	2,35
<i>Lophius piscatorius</i> I.....	—	7,2	10,60	3,06	3,46
<i>Merluccius merluccius</i> I.....	—	20,4	8,98	4,27	2,10
<i>Clupea pilchardus</i> I.....	Nageoire caudale	141			
— II.....	—	136			
— III.....	—	46,5			
— IV.....	—	125			
<i>Arnoglossus laterna</i> (moy.)..	Muscle	1,4	0,29	2,80	0,10
<i>Conger vulgaris</i> (moy.).....	—	2,8	0,36	3,36	0,10
<i>Trigla gurnardus</i> (moy.)....	—	2,8	0,40	3,27	0,12
<i>Arnoglossus laterna</i> I.....	Ecaillés	10,2	5,62	5,72	0,98
— II.....	—	13,4	5,62	4,34	1,29
<i>Labrus berggylta</i> I.....	—	40,9	5,00	6,57	0,76
— II.....	—	26,8	4,36	5,07	0,86
<i>Merluccius merluccius</i> I.....	—	17,6	5,14	4,15	1,23
<i>Microchirus variegatus</i> I....	—	28,4	6,92	5,16	1,33
— II.....	—	27,9	6,80	5,12	1,33
<i>Trigla gurnardus</i> I.....	—	105,7	6,33	4,60	1,37
— II.....	—	117,6	6,10	4,92	1,24
<i>Lophius piscatorius</i> I.....	Peau et écaillés	31,9	0,82	3,94	0,21
<i>Arnoglossus laterna</i> I.....	Peau	29,2	0,18	6,04	0,03
— II.....	—	18,9	0,32	5,14	0,06

Sur ces différentes espèces de Poissons osseux (Téléostéens) il a été procédé au dosage de l'activité phosphatasique d'une part et d'autre part à l'établissement du rapport : P/N, selon les méthodes indiquées plus haut. Les recherches ont été effectuées sur les vertèbres soigneusement débarrassés des tissus environnants et de la moelle, de même que sur le maxillaire inférieur (massif dento-angulo-articulaire), sur le massif ptérygopalaire, enfin sur les écailles détachées de la peau, et sur les dents. Pour celles-ci la difficulté a été généralement de les séparer de la pièce mandibulaire. Aussi, sauf pour le *Labrus berggylta* (Ascan.) dont les dents ont pu être extraites de leurs alvéoles, a-t-on dû se contenter de séparer de la mâchoire les couronnes dentaires faisant saillie. Un point de comparaison utile est fourni par la mesure de l'activité estérasiqne du muscle, lequel présente le double avantage d'être étranger au système osseux et de ne pas posséder comme le foie ou les reins des fonctions particulières (estérification métabolique, ou excrétion des phosphates) auxquelles ceux-ci doivent une teneur en phosphatase élevée.

Nous avons groupé dans le tableau VIII les résultats concernant des Téléostéens de l'Atlantique (J. ROCHE et E. BULLINGER) et de la Méditerranée (J. ROCHE et J. COLLET). L'examen de ce tableau montre que l'enzyme existe dans tous les os des Téléostéens, et que, par ailleurs, l'activité phosphatasique du système osseux est beaucoup plus élevée que celle des muscles. Ils apparaît de plus que, chez un même individu, les écailles (étudiées en été pour ces expériences) et les dents sont plus riches en estérase que les autres organes osseux. L'activité enzymatique des dents est plus élevée que celle des pièces mandibulaires leur servant de support. Or, la continuité de leur développement fait des dents des organes à croissance rapide, et il a été établi antérieurement par J. ROCHE et A. FILIPPI que la teneur élevée en phosphatase est l'apanage des tissus osseux qui se calcifient à un rythme accéléré (première enfance chez l'Homme).

En résumé, tous les os et les dents des Téléostéens contiennent la phosphomonoestérase A_1 .

2. *Localisation de la phosphatase dans les seules parties calcifiées des os des Sélaciens : os squelettiques, os dermiques, dents.*

L'*endosquelette* des Sélaciens est constitué par des organes cartilagineux entourées parfois d'un revêtement osseux plus ou moins important. L'*exosquelette*, (écailles, os dermiques) présente un caractère particulier, car les écailles ont une structure analogue à celle des dents. Enfin les dents des Sélaciens, comme celles des Téléostéens, sont continuellement renouvelées, mais avec une fréquence plus grande que chez ces derniers.

Les différents caractères des Sélaciens ayant servi à l'expérimentation sont résumés dans le tableau IX ci-après :

TABLEAU IX.

Données sur les Poissons cartilagineux ayant servi de matériel d'étude.

Nom scientifique	Nom usuel	N°	Taille	Particularités propres au système osseux de chaque espèce
<i>Carcharias glaucus</i> (L.)	Requin peau bleue	I	1 m.,22	Séries de dents à divers degrés de développement, animal en croissance.
—	—	II	1 m.,22	—
—	—	III	1 m.,62	id., animal adulte.
—	—	IV	2 m.,65	id., animal âgé.
<i>Isurus cornubicus</i> (Gmel.)	Lamie long nez	I	83 cm.	id., forte ossification dermique.
<i>Scylliorhinus stellaris</i> (L.)	Roussette	I	54 cm.	id., peu d'os dermiques, animal en croissance.
—	—	II	60 cm.	—
—	—	III	64 cm.	—
—	—	IV	96 cm.	id., animal adulte, os dermiques développés.
<i>Torpedo marmorata</i> (Risso) ...	Torpille	1	29 cm.	Pas d'os dermiques (*).

(*) Cette absence d'os dermiques a été établie par le fait que la digestion trypsique de la peau de Torpille n'a laissé aucun résidu calcaire appréciable.

§ 1. Les particularités de structure du tissu osseux des Sé-
laciens ont permis de comparer le pouvoir phosphoestérasique
des parties calcifiées et de celles demeurées cartilagineuses.
Les résultats sont rassemblés dans le tableau X, emprunté
à J. ROCHE et E. BULLINGER [17].

TABLEAU X.

Activité phosphatasique relative, teneur en phosphore (P) et en
azote (N) p. 100 du poids frais et rapport : P/N, des vertèbres,
de la mâchoire inférieure (dents non comprises), de la peau et
du muscle de POISSONS CARTILAGINEUX (*).

Animal	Organe ou tissu	Activité phospha- tasique	P p 100	N p. 100	P/N
<i>Carcharias glaucus</i> I.....	Vertèbre	53,4	1,70	2,31	0,73
— II.....	—	13,8	2,69	2,87	0,94
— III.....	—	23,5	2,01	2,98	0,68
— IV.....	—	8,6	4,32	2,41	1,78
<i>Isurus cornubicus</i> I.....	—	16,5	—	1,77	—
<i>Scylliorhinus stellaris</i> I.....	—	8,3	—	5,81	—
— II.....	—	36,1	—	3,60	—
— III.....	—	20,8	—	2,97	—
— IV.....	—	8,2	0,38	4,05	0,09
<i>Torpedo marmorata</i> I.....	—	37,3	3,65	2,52	1,45
<i>Isurus cornubicus</i> I.....	Maxillaire inf. total	20,8	—	5,57	—
<i>Scylliorhinus stellaris</i> I.....	—	29,8	—	4,41	—
— II.....	—	87,7	—	2,96	—
— III.....	—	64,7	—	3,70	—
<i>Torpedo marmorata</i> I.....	—	24,9	1,77	3,30	0,54
<i>Carcharias glaucus</i> I.....	Zone non calcifiée du maxil. inf.	3,1	0,24	2,05	0,17
— II.....	—	5,3	—	2,96	—
— III.....	—	2,4	0,07	2,73	0,03
— IV.....	—	2,1	1,65	5,30	0,33
<i>Scylliorhinus stellaris</i> IV.....	—	1,7	0,06	2,58	0,02
<i>Carcharias glaucus</i> I.....	Zone calcifiée du maxil. inf. a	334,0	3,83	2,88	1,33
— I.....	— b	228,8	8,26	3,21	2,57
— II.....	— a	152,9	6,38	3,02	2,11
— II.....	— b	220,0	5,14	2,52	2,03
— III.....	— a	115,0	4,37	2,93	1,49
— III.....	— b	115,3	3,96	3,22	1,23
— IV.....	— a	71,8	8,36	2,84	2,94
— IV.....	— b	45,8	9,71	3,01	3,22
<i>Scylliorhinus stellaris</i> IV.....	— a	146,8	1,78	3,98	0,44
<i>Carcharias glaucus</i> (moy.)..	Muscle	3,6	—	3,72	—
<i>Isurus cornubicus</i>	—	0,5	—	5,82	—
<i>Scylliorhinus stellaris</i> (moy.)	—	2,8	0,096	5,08	0,02
<i>Torpedo marmorata</i>	—	1,4	0,46	3,43	0,13

(*) L'expression « maxillaire inférieur total » se rapporte au cartilage
de MECKEL débarrassé des tissus avoisinants et des dents. Quant aux
zones calcifiées, celle désignée par a correspond au revêtement du car-
tilage de MECKEL sous-jacent à la base des dents, et celle désignée par
b à la paroi externe de la même pièce squelettique, dans la profondeur
de laquelle a été prélevé le cartilage non calcifié.

Seules les parties calcifiées de l'endosquelette des Sélaciens ont une teneur élevée en phosphatase ; celle-ci est au contraire très faible dans les zones demeurées molles. C'est ainsi que les régions calcifiées du maxillaire inférieur (revêtement de la gouttière sous-jacente à la base des dents et de la paroi externe du cartilage de MECKEL) sont riches en estérase, tandis que les parties cartilagineuses, prélevées dans la profondeur des pièces squelettiques, en sont dépourvues. La comparaison entre les valeurs de l'activité phosphatasique et celles du rapport : P/N, montre que seules les régions riches en phosphore ont une activité enzymatique notable.

Des faits du même ordre ont été observés [19] dans les diverses zones des boucles de Raie en voie de calcification. Seules les parties de ces organes étant le siège de processus d'ossification sont riches en enzyme ; le centre gélatineux des boucles en est très pauvre.

Ces résultats méritent d'être rapprochés de ceux obtenus par POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCAUMONT [6] sur la répartition de la phosphatase dans les diverses zones histologiques des os longs chez l'enfant. Dans un cas comme dans l'autre seules les régions se calcifiant contiennent l'enzyme.

3. - Absence de phosphatase dans les organes dentaires non calcifiables (Cyclostomes).

Ainsi que nous venons de le voir, les vertèbres, les os du crâne, les dents et les écailles des Téléostéens sont riches en phosphatase. Il en est de même pour les dents, les régions calcifiées des os dermiques et de l'endosquelette des Sélaciens, alors que les zones restant molles ne présentent point ou presque point d'activité phosphatasique. Il en résulte qu'il y a tout lieu de penser que, chez les Téléostéens et les Sélaciens comme chez les Mammifères, la phosphatase participe à la calcification. S'il en est ainsi il n'y a pas de raison apparente pour que l'enzyme se trouve en forte proportion dans les dents cornées des Cyclostomes.

Les expériences que nous avons faites pour le vérifier ont porté sur un Cyclostome, la Lamproie marine (*Petromyzon marinus* L.), dont cinq « mâchoires » d'animaux pêchés dans la Vienne en mai 1939 nous ont été adressées par M. FONTAINE, assistant à l'Institut Océanographique, à qui nous exprimons nos remerciements.

Nous avons rassemblé dans le tableau XI les valeurs de l'activité phosphatasique moyenne des dents chez différentes espèces de poissons cartilagineux et osseux (J. ROCHE et E. BULLINGER, J. COLLET [19].

TABLEAU XI.

Activité phosphatasique moyenne des dents, chez les Poissons appartenant à divers ordres (Cyclostomes, Sélaciens et Téléostéens).

Ordre et espèce zoologique		Nombre d'animaux étudiés	Activité phosphatasique des dents
A. — POISSONS CARTILAGINEUX.			
Cyclostome..	<i>Petromyzon marinus</i> (L.).....	5	3
Sélacien....	<i>Scylliorhinus stierallii</i> (L.).....	4	80
Sélacien....	<i>Carcharias glaucus</i> (L.).....	4	330
Sélacien....	<i>Isurus cornubicus</i> (Gmel).....	1	47
Sélacien....	<i>Torpedo marmorata</i> (Risso).....	2	115
B. — POISSONS OSSEUX.			
Téléostéen..	<i>Conger vulgaris</i> (Cuvier).....	5	40
Téléostéen..	<i>Arnoglossus paterna</i> (Artedi).....	2	30
Téléostéen..	<i>Labrus berggylta</i> (Ascanius).....	2	60
Téléostéen..	<i>Lophius piscatorius</i> (L.).....	1	
Téléostéen..	<i>Merluccius merluccius</i> (L.).....	1	22

Les dens sont dépourvues de phosphatase chez les Cyclostomes alors qu'elles en sont fort riches chez les Téléostéens et davantage encore chez les Sélaciens.

Ceci est en relation avec la structure anatomique des organes dentaires de ces différentes espèces : chez les Cyclostomes les dents sont de simples appendices cornés ne se calcifiant pas (1), tandis que chez les Sélaciens et les Téléostéens elles présentent une structure analogue à celle des dents des vertébrés supérieurs. Enfin, chez les Sélaciens le processus de renouvellement dentaire est beaucoup plus rapide. Ceci explique la richesse plus grande en enzyme, qui est toujours très élevée au cours des phénomènes d'ossification rapide.

(1) C'est là une des particularités anatomiques des Cyclostomes, lesquels présentent par ailleurs des différences morphologiques, biochimiques et physiologiques avec les Sélaciens et les Téléostéens telles que l'on tend à les considérer comme formant un ordre particulier d'animaux, à la base d'un embranchement des Vertébrés.

On trouvera une discussion de l'aspect biochimique de ce problème dans un récent travail de J. ROCHE et FONTAINE (*Ann. Inst. Océanograph.*, 1940, 20, 77-86)

4. *Activité phosphatasique des os dermiques (écailles)
et de la peau.*

Les Poissons se distinguent des autres Vertébrés par la grande extension de leur dermosquelette. Cependant certains groupes en sont dépourvus. Des recherches sur l'activité phosphatasique de leurs os dermiques et de leur peau ont été poursuivies en juin-juillet sur différentes espèces de Poissons osseux ou cartilagineux présentant ou non des écailles. Elles ont porté :

1° Sur six Poissons cartilagineux dont deux sans écailles : un Cyclostome, la Lamproie marine (*Petromyzon marinus* L.) un Sélacien sans os dermiques, la Torpille (*Torpedo marmorata* Risso) ; trois Sélaciens présentant des os dermiques inclus dans la peau : la Rousette [*Scylliorhinus Stellaris* (L.)], la Lamie long nez [*Issurus cornubicus* (Gmel.)], le Requin peau bleue (*Carcharias glaucus* (L.)) et un Sélacien, la Raie cloutée (*Raja clavata* Rondelet) ayant des os dermiques faciles à isoler.

2° Sur sept espèces de Poissons osseux : un Téléostéen dépourvu d'écailles, le Congre [*Conger vulgaris* Cuvier], et six autres portant un dermosquelette plus ou moins important : un Pleuronecte [*Arnoglossus laterna* (Artedi)], la Vieille [*Labrus berggylta* (Ascanius)], le Merlu [*Merluccius merluccius* (L.)], un Soléïdé [*Microchirus variegatus* (Donovan)], un Grondin [*Trigla gurnadus* (L.)], la Sardine [*Clupea pilchardus* Walb.]. Les dosages de l'activité phosphatasique, effectués sur la peau et les os dermiques après un très soigneux nettoyage, ont été rassemblés dans le tableau XII (J. ROCHE, E. BULLINGER, J. COLLET [18]).

Les faits observés [17, 18, 19] montrent que seuls les téguments renfermant des os dermiques contiennent des quantités notables de phosphatase. Celle-ci est à peu près inexistante dans la peau dépourvue d'écailles du Congre, de la Torpille, de la Lamproie. Par contre elle est très élevée chez les autres : la Vieille, la Baudroie, le Merlu, le Grondin etc. Cette constatation est générale pour la classe des Poissons, quel que soit l'ordre (osseux ou cartilagineux) auquel appartient l'espèce étudiée.

Par ailleurs la teneur en phosphatase de la peau et des écailles est en rapport avec l'abondance et la dureté des os dermiques. Ainsi la peau du Merlu, espèce pauvre en écailles,

est peu riche en phosphatase, à l'inverse de ce qui se passe pour les Pleuronectes, la Vieille, le Grondin, dont les os dermiques sont nombreux et durs.

TABLEAU XII.

Activité phosphatasique relative, moyenne des os dermiques, de la peau et du muscle chez les Poissons appartenant à divers ordres.

Ordre et espèce zoologique		Nombre d'animaux étudiés	Os dermiques	Peaux	Muscles
A. — POISSONS CARTILAGINEUX.					
Cytoclosme.	<i>Petromyzon marinus</i> (L.).....	5	(Pas d'écailles)	1	
Sélacien	<i>Scylliorhinus stellaris</i> (L.)	4	(Os inclus dans la peau)	80	2,8
—	<i>Carcharias glaucus</i> (L.).....	4	—	16	3,6
—	<i>Isurus cornubicus</i> (Gmel).....	1	—	62	0,5
—	<i>Torpedo marmorata</i> (Risso) ...	2	(Pas d'écailles)	2	1,4
—	<i>Raja clavata</i> Rondelet	4	25 (*)		
B. — POISSONS OSSEUX.					
Téléostéens.	<i>Conger vulgaris</i> (Cuvier).....	5	(Pas d'écailles)	3	2,8
—	<i>Arnoglossus laterna</i> (Arledi)...	2	25	10	1,4
—	<i>Labrus berggylta</i> (Ascan.).....	2	35	45	
—	<i>Merluccius merluccius</i> (L.)	1	18	9	
—	<i>Microchirus variegatus</i> (Donovan)	2	28	91	
—	<i>Trigla gunardus</i> (L.).....	2	108	76	2,8
—	<i>Clupea pilchardus</i> (Walb.).....	7	50	16	

(*) Boucles de Raie en voie d'ossification.

C. — Conclusions.

1° Le système osseux des Poissons, aussi bien Téléostéens que Sélaciens, contient une phosphatase dont les caractères sont ceux de la phosphomonoestérase A₁ de la classification de FOLLEY et KAY. Cet enzyme est caractérisé par un pH optimum d'action à 8,5-9,0, une action plus grande sur les β - que α -glycérophosphates ; il est activé par les ions Mg⁺⁺, dont la concentration optima correspond à q Mg = 2,5-3,0. Cet enzyme est donc identique à celui présent dans le système osseux des Vertébrés supérieurs.

2° Les différents organes osseux des Téléostéens (vertèbres, crâne, mâchoires, dents, écailles) contiennent de la phosphatase.

3° Seules les régions ossifiées des os cartilagineux des Sélaciens renferment des quantités notables de l'enzyme.

4° Les dents, organes à croissance continue chez les Poissons, sont très riches en phosphatase. Celles des Sélaciens, à renouvellement plus fréquent que celles des Téléostéens, présentent une activité phosphatasique très intense. Aucune activité enzymatique, n'existe par contre dans les appendices dentaires cornés des Cyclostomes.

5° Enfin la peau ne présente une teneur en enzymes appréciable que chez les espèces pourvues d'écaillés, cette teneur étant d'ailleurs en relation avec le développement du dermosquelette.

6° Il ressort de tous ces faits que, chez les Poissons comme chez les Vertébrés supérieurs, l'enzyme est présent dans les différents organes osseux en voie de calcification.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BAMANN (E.) und RIEDEL (E.). — Ueber das Vorkommen zweier durch das pH-Wirkungsoptimum unterscheidbaren Phosphatasen in tierischen Organen. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1934, **229**, 125-150.
2. BODANSKY (S.), BAKWIN (R. M.) and BAKWIN (H.). — The distribution of phosphatase in the tissues of teleosts and elasmobranchs. *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **94**, 551-560.
3. FOLLEY (S. J.) and KAY (H. D.). — The phosphatasen. *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 1 vol., 378 p., Akad. Verlagsges. édit., Leipzig, pp. 159-212.
4. JENNER (H. D.) and KAY (H. D.). — The phosphatasen of mammalian tissues. III. Magnesium and the phosphatase system. *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 733-748.
5. Mac FARLANE (M. Q.), PATTERSON (L. M. B.) and ROBISON (R.). — The phosphatase activity of animal tissue. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 720-724.
6. POLICARD (A.), PÉHU (M.), ROCHE (J.) et BOUCAUMONT. — Répartition histologique de la phosphatase dans la zone d'ossification des os longs chez l'enfant normal et rachitique. *Bull. Histol. appl.*, 1931, **8**, 171-175.
7. PORTIER (P.) et FONTAINE (M.). — Sur la teneur en calcium du sang des Poissons marins. *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **193**, 1218.
8. POUCHET (G.) et BEAUREGARD (H.). — Traité d'ostéologie comparée. 1 vol., 464 p., G. Masson éd., Paris, 1889.
9. PRENANT (M.). — Les formes minéralogiques du calcium chez les êtres vivants. *Biol. Rev.*, 1926, **2**, 365-393.

10. ROBISON (R.). — Bone phosphatase. *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 1 vol., 375 p., Akad. Verlagsges. éd., Leipzig, pp. 280-294.
 11. ROBISON (R.) et FELL (H. B.). — The development of the calcifying mechanism in avian cartilage in osteoid tissue. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 2243-2253.
 12. ROBISON (R.) and NIVEN (G. F. S.). — The development of the calcifying mechanism in the long bones of rabbits. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 2337-2342.
 13. ROCHE (A.) et GARCIA (I.). — Recherches sur l'ossification. I. Ossification normale et constitution de réserves minérales au cours du développement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 1014-1026.
 14. ROCHE (A.), ROCHE (J.) et MARCELET (Y.). — *Idem* IV., Ossification des os plats, étapes du développement du squelette et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 705-717.
 15. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et LEANDRI (A.). — *Idem*. III. La phosphatase des os longs aux diverses étapes de la croissance. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314-1324.
 16. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur la spécificité des phosphoestérases. Contribution à l'étude des phosphomonoestérases du foie et du rein. *Enzymol.*, 1937, **3**, 75-81.
 17. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — *Idem*. VII. La phosphatase du squelette (os, dents, dermatosquelette) chez les poissons osseux ou cartilagineux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 166-186.
 18. ROCHE (J.), BULLINGER (E.) et COLLET (J.). — Activité phosphatasique des dents et du dermatosquelette chez les poissons (Cyclostomes, Sélaciens et Téléostéens). *Enzymolog.*, 1939, **7**, 273-277.
 19. ROCHE (J.), COLLET (J.) et MOURGUE (M.). — Activité phosphatasique et croissance des os dermiques (Ecailles) chez les Poissons (Sélaciens et Téléostéens). *Enzymolog.*, 1940, **8**, 257-260.
 20. STEPHAN (P.). — Recherches histologiques sur la structure du tissu osseux des Poissons. *Thèse Doct. Sc. nat.*, série A, n° 368, Paris, 1900, 1 vol., 434 p.
-



CHAPITRE III.

Activité phosphatasique des os et des dents des Téléostéens et des Sélaciens aux diverses étapes de leur développement et rôle physiologique de la phosphatase dans l'ossification.

Les os des Poissons osseux et cartilagineux contiennent une phosphatase identique à la phosphomonoestérase A_1 de la classification de FOLLEY et KAY, existant par ailleurs dans le squelette des Vertébrés supérieurs (ROBISON, ROCHE). Cet enzyme, qui participe au mécanisme d'enrichissement en ions phosphoriques dans le squelette des Mammifères et des Oiseaux, joue-t-il le même rôle dans la calcification des os des Poissons ?

A priori les particularités que présente la structure de ces organes chez les Téléostéens ne permettent pas de leur étendre sans contrôle les données acquises chez les Vertébrés supérieurs. Le Professeur J. ROCHE, ayant pensé que l'étude de ce problème devait permettre d'abord une discussion générale sur le rôle de la phosphatase dans les processus ostéogénétiques a entrepris soit avec E. BULLINGER, soit avec moi-même une série de travaux. Nous avons réuni dans ce chapitre l'ensemble des résultats acquis au cours de ces recherches portant sur :

1° L'activité phosphatasique des os aux diverses étapes de la croissance chez les Téléostéens, animaux sujets à une métamorphose et à des poussées saisonnières de croissance.

2° Les modifications de la teneur en phosphatase des dents au cours du développement de ces organes chez les Sélaciens.

lesquels offrent, à cet égard, un matériel d'étude particulièrement intéressant, du fait qu'ils présentent plusieurs séries de dents de remplacement à divers stades de croissance.

A. Etude de l'activité phosphatasique des divers os de la Sardine méditerranéenne au cours de son développement.

I. — *Introduction.*

Le développement des Poissons osseux s'effectue par étapes correspondant à une succession de cycles, dont le premier comprend la métamorphose d'un alevin en animal parfait. Au cours de ceux-ci l'accroissement des os évolue suivant des modalités différentes de celles que l'on observe chez les Vertébrés supérieurs ; aussi ce processus mérite-t-il de retenir l'attention.

Chez les Téléostéens, la croissance a lieu, une fois la métamorphose accomplie, selon un rythme comportant à chaque printemps une poussée d'allongement qui alterne avec des périodes dites « de repos » pendant la saison froide. L'endosquelette (crâne, vertèbres, ceinture scapulaire) et le dermosquelette (écailles) ont tous un développement caractérisé par la même discontinuité. Il en est de même des otolithes, concrétions calcaires du saccule de l'oreille interne constituées presque exclusivement (96 p. 100) par du carbonate de calcium.

L'examen anatomique des os révèle l'existence à leur surface et dans leur épaisseur, de stries concentriques visibles sur les écailles et les coupes des autres pièces squelettiques. Chacun des anneaux ainsi délimité correspond au gain de taille réalisé pendant une période annuelle de croissance.

LEUWENHÖCHT (1696) avait établi dès la fin du XVII^e siècle ce fait, que les ichtyologues ont depuis mis à profit pour déterminer l'âge des Poissons, opération d'une importance pratique considérable pour la pêche. Aussi de nombreux travaux ont-ils porté sur des organes osseux tels que les écailles et les otolithes, dont les stries annuelles sont particulièrement nettes.

LE GALL [7] et MURAT [9] ont rassemblé sur la « lecture des écailles », ou scalimétrie, un ensemble important de tra-

vaux et la monographie de CHAINE et DUVERGIER [2] contient à cet égard une abondante documentation sur les otolithes.

Néanmoins quelques organes osseux particuliers tels que les dents et les rayons de la nageoire caudale ont un développement à peu près ininterrompu réparant une usure continue.

Ces particularités anatomiques offrent à la biochimie un large champ d'expériences. Il nous a semblé particulièrement intéressant d'aborder le rôle de la phosphatase dans la formation du squelette des Téléostéens.

Chez les Vertébrés supérieurs, la phosphatase provoque au niveau des os un enrichissement en ions $\text{PO}_4^{=}$ favorisant les calcifications rapides (ROBISON [12]). Si cet enzyme a le même rôle chez les Poissons, il est possible de penser que son taux dans les différentes pièces osseuses doit subir une modification parallèle à leur croissance, aussi bien dans la première période de développement comparable à celle des Mammifères et des Oiseaux que pendant les poussées saisonnières d'allongement particulière aux Poissons.

Cette hypothèse découle des travaux poursuivis sur les os des Mammifères, établissant que la phosphatase n'existe en abondance dans le squelette qu'aux périodes de croissance osseuse active (ROBISON et NIVEN [14] ; ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [17]) ; elle a servi de point de départ à nos expériences. Nous avons abordé l'étude de ce problème en prenant comme matériel d'étude la Sardine de la Méditerranée (*Clupea pilchardus* Walb.), espèce sur laquelle ont été poursuivies de remarquables recherches de biométrie, dues surtout à FAGE [4], sans lesquelles notre travail n'aurait pas été possible.

Le but de ces recherches est l'étude quantitative de l'activité phosphatasique des divers organes osseux de Sardines de divers âges pendant un cycle annuel de croissance. Cette étude devait permettre :

1° de préciser la teneur en phosphatase des divers os de la Sardine au cours de la métamorphose et du développement de l'animal jeune ;

2° de suivre l'activité enzymatique des os aux diverses époques de l'année.

Nous espérons mettre ainsi en évidence un parallélisme entre l'activité phosphatasique des os et leur vitesse de croissance, tant pendant la première période annuelle de celle-ci

que pendant les « poussées d'allongement » des printemps ultérieurs.

2. — *Matériel d'étude, contrôle du degré de croissance et techniques.*

a) MATÉRIEL D'ÉTUDE.

Les recherches ont été poursuivies sur des Sardines pêchées en Méditerranée septentrionale à toutes les époques de l'année et comprenant des alevins, des immatures et des adultes. Les animaux de taille inférieure à 6 cm. (poutines) proviennent de pêches effectuées au printemps de 1938-1939 dans la baie de Nice (1) ; ceux de taille supérieure ont été capturés dans le Golfe de Marseille aux divers mois des mêmes années.

De nombreux auteurs, FAGE [4], GOURRET [6], MARION [8], MURAT [9] ont étudié le développement de la Sardine en Méditerranée, GOURRET et MARION ayant particulièrement étudié les animaux du Golfe de Marseille et de la côte provençale. La remarquable monographie de L. FAGE sur les Clupéidés nous a fourni la documentation nécessaire à l'établissement de l'âge et du degré de croissance des Sardines, ce qui nous a permis de classer les résultats obtenus sur des Sardines de la Méditerranée septentrionale d'une longueur comprise entre 25 et 140 mm.

Un bref rappel des particularités propres au développement de ce Téléostéen est indispensable à la compréhension des recherches poursuivies et des résultats obtenus.

b) CONTRÔLE DU DEGRÉ DE CROISSANCE.

L'époque de ponte, définie par HOEK comme étant « celle où la grande majorité d'une espèce se propage », est optimale à la température de 13-14°. Elle est donc différente pour une même espèce selon la latitude à laquelle vit le Poisson, (Méditerranée, Manche, Atlantique). En Méditerranée elle s'étend sur les mois de décembre, janvier, février, bien qu'on

(1) Nous remercions M. H. MARCELET et Mlle M. T. SIMONOT de nous avoir procuré les poutines sur lesquelles ont porté les expériences. Le traité d'annexion du Comté de Nice à la France réserve le droit des pêcheurs de la région Nîçoise à la pêche aux alevins de Sardine, interdite sur le reste du littoral méditerranéen, en sorte que notre travail n'a été possible que grâce à la récolte de matériel opérée dans la région nîçoise.

puisse trouver des larves à peu près en toutes saisons. Les pontes ont donc lieu généralement en hiver ; l'œuf pélagique éclot au bout de 4 jours en donnant une larve d'environ 3,5 mm. qui, dix jours plus tard, mesure 5,5 mm. et entre dans la phase post-larvaire, la résorption du vitellus étant alors complète. A partir de ce moment l'alevin croît régulièrement (l'augmentation du tronc équivalant la somme des augmentations de la queue et de la tête), il atteint en quatre mois 45 à 50 mm., taille à laquelle il se métamorphose. On assiste alors à une « crise de croissance » qui se traduit par un ralentissement de l'allongement du corps dû à un arrêt de croissance du tronc. Selon FAGE, le gain de taille avant la métamorphose, pour un animal passant de 16 à 37 mm. par exemple, se répartit ainsi :

la tête, mesurant 2,2 mm., gagne 4,8 mm.
la queue, mesurant 2,2 mm., gagne 4,3 mm.
le tronc, mesurant 10,5 mm., gagne 8 mm.

Pendant la métamorphose, l'animal passe de 37 à 44 mm. ; les gains des divers segments étant les suivants :

la tête, mesurant 7 mm., gagne 2 mm.
la queue, mesurant 6,5 mm., gagne 3,5 mm.
le tronc, mesurant 18,5 mm., gagne 0 mm.

Ces chiffres sont démonstratifs — « le développement post-larvaire de la Sardine, jusqu'à la métamorphose, est remarquable par sa grande régularité, l'allongement du corps étant dû en parties égales à celui du tronc, et à celui de la tête et de la queue. Au cours de la métamorphose, le tronc cesse de s'accroître, la tête et la queue continuent seules à s'allonger » (*loc. cit.* p. 42 FAGE [4]). La métamorphose a une importance considérable non seulement au point de vue du développement des larves, mais encore à celui du déplacement des bancs de Sardines. A ce moment les alevins s'approchent en nombre considérable de la côte. Les pêcheurs provençaux les dénomment « poutines » et distinguent celles dont les écailles ne sont pas encore formées (*poutines nues*) de celles couvertes d'écailles (*poutines vêtues*) ; ces deux appellations populaires correspondent à deux stades de l'alevin (antérieur et immédiatement postérieur à la métamorphose). Après la métamorphose commence la phase immature caractérisée par le changement de livrée. La croissance redevient active et régulière jusqu'à la saison froide. Lorsque survient l'arrêt hivernal de

croissance, les alevins des pontes de l'automne précédent atteignent 10-11 cm., ceux des pontes tardives 8-9 cm. L'époque de la ponte a donc une action considérable sur le développement des immatures.

Celles-ci ont une croissance identique à celle des larves avant la métamorphose. Voici à cet égard quelques chiffres relevés dans la monographie de L. FAGE. Pour un alevin de 44 mm. augmentant de 52 mm. la répartition dans les différentes parties est la suivante :

la tête mesurant 9 mm., en gagne 13
la queue mesurant 10 mm., en gagne 14,5
le tronc mesurant 18,5 mm., en gagne 24,5

Donc ici encore, comme avant la métamorphose, le gain de taille réalisé par le tronc est pratiquement égal à l'ensemble de l'accroissement de la tête et de la queue.

Le rythme de la croissance pendant la première année de vie est représenté par les graphiques de la figure 9, concernant l'un la moyenne de la croissance annuelle, et l'autre celle de la croissance mensuelle.

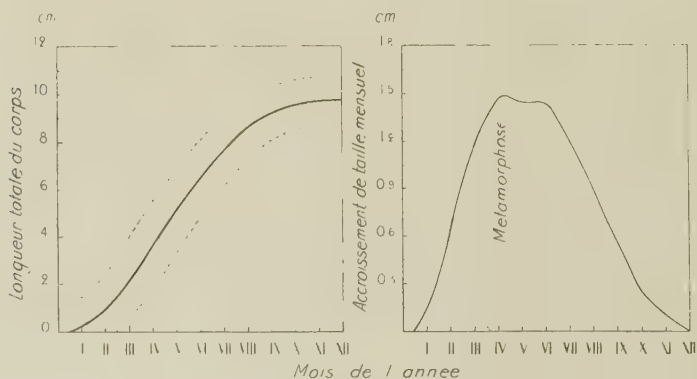


FIGURE 9.

- A. — Courbe de croissance moyenne de la Sardine pendant la première année de vie en Méditerranée (d'après L. FAGE). Abscisses = mois de l'année. Ordonnées = taille en centimètres (Tracé continu : valeurs moyennes ; tracés discontinus : valeurs extrêmes).
- B. — Courbe de croissance *mensuelle* moyenne de la Sardine pendant la première année de vie en Méditerranée, calculée à partir des données rapportées sur la partie A de la même figure. Abscisses = mois de l'année. Ordonnées = accroissement de taille mensuel en centimètres.

A la suite de cette première année d'existence et de ce premier repos hivernal survient une nouvelle période de crois-

sance qui réapparaît au cours des années suivantes. Le développement des Sardines s'effectue donc par périodes actives alternant avec des périodes d'arrêt. La poussée saisonnière d'allongement, commençant en mars-avril, se généralise en été et disparaît en automne. La Sardine emploie la nourriture abondante qu'elle trouve durant la belle saison pour se développer et pour accumuler des réserves lipidiques qu'elle utilise pendant l'hiver. « Les périodes de croissance active et d'engraissement correspondent à la belle saison, les périodes de repos aux conditions climatiques les plus défavorables, qui coïncident elles-mêmes avec la maturité génitale » (L. FAGE [5] *loc. cit.* p. 62). L'augmentation saisonnière n'est pas de même importance aux différentes années de vie de l'animal. En effet pendant la seconde année elle est de 3 cm. et de 1 cm. pendant les années suivantes. La Sardine ne vit en Méditerranée que 5 ans. Quelques auteurs ont parlé de spécimens beaucoup plus âgés et mesurant jusqu'à 20 et même 24 cm. ; ceux-ci sont rares. Nous n'avons pas eu l'occasion d'expérimenter sur des animaux dépassant 15 cm., ce qui correspond à la cinquième année de vie. La moyenne des chiffres permettant d'établir un rapport entre la taille et l'âge des individus sont rassemblés dans le tableau XIII. Bien que la croissance soit très régulière, il faut tenir compte non seulement de différences individuelles, mais encore du dimorphisme sexuel, les mâles étant un peu plus petits que les femelles issues de la même ponte.

TABLEAU XIII.

Taille moyenne de la Sardine aux diverses époques de la vie en Méditerranée.

Age moyen	Longueur totale moyenne (mm.)	Stade de développement
15 jours	3	Larve
4 mois	45	Métamorphose
1 an	98	Jeune (immature)
2 ans	129	Adulte
3 ans	141	Adulte
4 ans	150	Adulte
5 ans	155	Adulte

La scalimétrie ou « lecture des écailles » fournit entre autres indications celle de l'âge de l'animal. En effet, comme nous l'avons signalé, il est possible d'après le nombre de stries concentriques inscrites sur une écaille de déduire le nombre d'années de vie.

Chez la Sardine, les écailles, malgré des formes assez variables, ont un mode de croissance et une structure identiques. Les écailles sont des os membraneux typiques, constituées par des feuilletts dont chacun est formé d'une couche de fibres parallèles entre elles mais formant un certain angle avec celles du feuillet suivant. La croissance de l'écaille s'opère par la face inférieure sur laquelle apparaissent des feuilletts très minces de plus en plus grands, dont les bords maginaux deviennent visibles à la face supérieure quand ils dépassent le bord des feuilletts plus anciens. Il se forme de ce fait une série de crêtes concentriques au bord radial de l'écaille (LEUWENHOECHT, MURAT [9]) comme on peut le constater sur la figure 10.

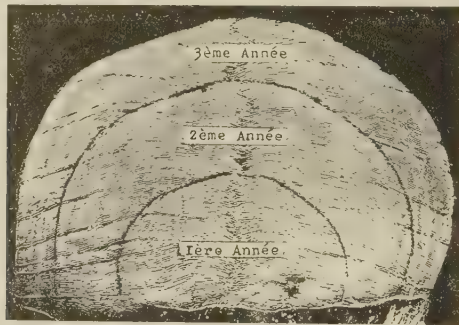


FIGURE 10. — Une écaille de Hareng montrant les anneaux d'hivers (sombres) et les anneaux d'été (clairs) se succédant du centre à la périphérie. (D'après LEA).

A chaque période d'allongement, l'écaille s'agrandit par une zone concentrique à la précédente et séparée de celle-ci par une ligne, « l'anneau d'hiver », correspondant à l'arrêt de croissance. L'examen de l'écaille à la lumière polarisée fait apparaître des « bandes claires et sombres » alternées, sensiblement concentriques, qui correspondent au pourtour des feuilletts. Chaque poussée de croissance est caractérisée par un certain nombre de feuilletts (SAVAGE). C'est ainsi que la première zone de croissance, correspondant à la première année,

comprend une vingtaine de feuillets ; la seconde, dix au plus ; les troisième et quatrième deux à quatre feuillets. Donc la croissance de l'écaille, de même que l'allongement du squelette de l'animal, diminue progressivement chaque année. Certains auteurs ont établi, pour une même période, une relation entre le gain de taille de l'écaille et l'allongement total du corps. Lors du ralentissement de la croissance, les feuillets débordent de moins en moins les uns sous les autres, et enfin ne dépassent plus du tout le bord. C'est ce qui se produit l'anneau d'hiver, visible au microscope et souvent à la loupe. La figure 10 (LE GALL, fig. 5, p. 384 [7]) illustre cet état de chose. En comptant les anneaux d'hiver en lumière ordinaire ou mieux en lumière polarisée on peut déterminer le nombre d'années de vie du Poisson.

La difficulté de la lecture des écailles provient du fait qu'en dehors des anneaux d'hiver, l'écaille peut porter de nombreux autres anneaux plus ou moins bien formés provenant d'arrêts accidentels (MURAT). SAVAGE les distingue à la lumière polarisée par le fait que l'anneau d'été comprend une série de marges de moins en moins larges et que l'anneau d'hiver se place entre la plus petite marge d'une série décroissante, et immédiatement avant la plus grande marge d'une nouvelle série. Au contraire les faux anneaux sont formés de marges étroites s'intercalant brusquement dans une progression régulièrement décroissante. Quels sont les facteurs intervenant dans les arrêts de croissance ? Certains auteurs incriminent l'abaissement de température, d'autres (FAGE, BOUNHIOL) l'épuisement provoqué par la période génitale, d'autres la raréfaction de nourriture. Quoi qu'il en soit L. FAGE remarque que « les écailles de la Sardine de l'Atlantique montrent avec une netteté plus grande que celle de la Sardine de Méditerranée, l'inscription des stries hivernales régulières » (FAGE [4] 1920 p. 66). Les renseignements fournis à la fois par la taille des animaux et le nombre d'anneaux existant dans les écailles ont permis de déterminer l'âge des Sardines.

c) TECHNIQUE.

Nous avons dosé l'activité phosphatasique des os de Sardine par la méthode ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [17], laquelle permet de rapporter le pouvoir phosphoestérasique d'un frag-

ment osseux à son stroma protéique, ce qui réduit au minimum l'erreur pouvant être introduite dans les mesures par des différences dans le degré de calcification des os étudiés.

Enfin nous avons fait des expériences comportant parallèlement une série avec et sans addition de sulfate de magnésium comme activateur. Pour la première série nous avons réalisé la concentration optima du milieu en sulfate de magnésium, déterminée antérieurement (chap. II).

3. — *Résultats expérimentaux.*

Les tableaux XIV, XV et XVI contiennent les résultats de nos expériences, groupés dans l'ordre qui nous a semblé le plus propre à mettre en relief certains faits qui seront exposés plus loin.

a) ANIMAUX D'ÂGES DIVERS EN PÉRIODE DE CROISSANCE (DE MARS A JUILLET).

Nous avons rassemblé dans le tableau XIV les valeurs de l'activité phosphatasique relative des vertèbres, de la voûte crânienne et de la nageoire caudale aux divers stades du développement de la Sardine au moment de la poussée saisonnière. Les graphiques tirés de ces tableaux sont représentés dans la figure 10.

b) ANIMAUX ÂGÉS DE PLUS D'UN AN ÉTUDIÉS PENDANT UN CYCLE ANNUEL COMPORTANT UNE PÉRIODE DE CROISSANCE ET UNE PÉRIODE DE REPOS.

Pour apprécier les variations de l'activité phosphatasique durant un cycle annuel, nous avons réuni dans les tableaux XV et XVI les résultats expérimentaux concernant les différentes pièces osseuses (vertèbres, voûte crânienne, nageoire caudale) de Sardines arrivées à la seconde ou troisième année de vie. Ceci nous a permis d'examiner une période de vie de l'animal intermédiaire à la première année d'existence, au cours de laquelle la croissance est très rapide, et aux dernières années dans lesquelles celle-ci est très lente. Les os d'animaux de même taille, pêchés simultanément peuvent présenter des écarts individuels importants de leur activité phosphatasique, dûs principalement à deux cau-

TABLEAU XIV.

Activité phosphatasique relative des vertèbres, de la voûte crânienne et de la nageoire caudale de la Sardine en période de croissance (de mars à juillet) au cours de ses trois premières années de développement en Méditerranée.

Mois de capture	Stade de développement et taille	Age approxi- matif	Activité phosphata- sique des		
			Voutes cra- niennes	Ver- tèbres	Nageoires caudales
Mars	25 mm., larve (*)	2 mois	—	18,5	—
Mars	28 mm., larve (*)	3 mois	29,1	20,2	—
Mars	28 mm., larve (*)	3 mois	32,7	21,6	—
Avril	30 mm., larve (*)	3 mois	—	24,0	—
Mars	30 mm., larve (*)	3 mois	—	27,0	—
Avril	35 mm., larve (*)	4 mois	—	29,0	—
Avril	35 mm., larve (*)	4 mois	36,6	30,0	—
Avril	35 mm., larve (*)	4 mois	37,9	29,0	—
Avril	38 mm., larve (*)	4 mois	36,3	34,6	—
Avril	40 mm., larve (*)	4 mois	—	17,6	—
Avril	40 mm., larve (*)	4 mois	32,2	23,6	—
Avril	40 mm., larve (*)	4 mois	67,7	46,8	—
Avril	48 mm., métamorphose	5 mois	—	17,4	—
Avril	48 mm., métamorphose	5 mois	23,4	17,5	—
Mars	50 mm., métamorphose	5 mois	23,4	17,5	—
Avril	53 mm., métamorphose	5 mois	—	—	65,7
Juin	60 mm., immature	6 mois	20,3	27,6	86,0
Juin	70 mm., immature	7 mois	26,4	22,6	100,0
Juin	80 mm., immature	8 mois	27,1	20,6	100,0
Juin	90 mm., immature	10 mois	30,0	21,2	157,0
Mai	100 mm., immature	12 mois	11,8	12,4	—
Mai	104 mm., immature	14 mois	15,3	11,2	—
Mai	105 mm., immature	14 mois	—	12,6	—
Mai	105 mm., immature	14 mois	17,7	8,2	49,0
Mai	110 mm., immature	16 mois	15,8	11,4	—
Mai	111 mm., immature	16 mois	6,9	4,3	—
Mai	117 mm., immature	18 mois	5,7	8,8	—
Juin	120 mm., immature	18 mois	—	7,2	—
Mai	120 mm., immature	18 mois	12,6	7,9	—
Mai	120 mm., immature	18 mois	10,0	7,3	—
Mai	121 mm., immature	18 mois	9,4	7,4	—
Mai	122 mm., immature	18 mois	9,6	7,2	—
Juin	124 mm., immature	20 mois	8,7	5,8	—
Mai	125 mm., immature	20 mois	8,4	7,7	—
Mai	125 mm., immature	24 mois	10,4	7,7	43,9
Mai	125 mm., immature	24 mois	—	10,0	43,8
Mai	128 mm., adulte	24 mois	10,7	10,4	—
Mars	130 mm., adulte	26 mois	8,5	6,2	26,8
Avril	130 mm., adulte	26 mois	13,6	6,3	—
Avril	130 mm., adulte	26 mois	10,0	6,5	33
Juillet	131 mm., adulte	28 mois	15,2	9,5	—
Juillet	132 mm., adulte	30 mois	—	13,4	—
Mai	140 mm., adulte	36 mois	20,0	10,0	38,1

(*) Mesures faites sur les os provenant de plusieurs animaux.

TABLEAU XV.

Activité phosphatasique relative des os de la voûte du crâne, des vertèbres et de la nageoire caudale de la Sardine au cours du second cycle annuel de croissance (du treizième au vingt-quatrième mois de vie) en Méditerranée.

Mois de capture	Taille (en mm.)	Activité phosphatique des		
		Voutes craniennes	Vertèbres	Nageoires caudales
Janvier.....	102	9,9	6,2	20,8
Janvier.....	105	9,8	6,2	30,5
Janvier.....	105	10,8	8,3	28,0
Janvier.....	105	8,5	7,0	18,9
Janvier.....	106	9,2	5,3	11,5
Janvier.....	115	7,2	5,7	—
Janvier.....	115	11,8	8,9	11,0
Janvier.....	120	6,3	7,0	27,0
Janvier.....	120	12,0	6,4	31,0
Janvier.....	120	8,5	—	21,7
Février.....	105	9,0	7,5	21,0
Février.....	105	9,9	8,6	—
Février.....	110	8,8	6,7	18,1
Février.....	115	13,9	6,1	32,0
Février.....	125	—	4,9	13,6
Février.....	125	6,0	6,1	—
Mars.....	120	12,6	7,9	22,8
Avril.....	120	10,0	7,3	24,0
Mai.....	100	11,8	12,4	—
Mai.....	104	15,3	11,2	—
Mai.....	105	17,7	8,2	49,0
Mai.....	110	15,8	11,4	45,0
Mai.....	120	9,4	7,1	—
Mai.....	121	9,6	7,1	—
Mai.....	125	10,4	7,7	43,9
Mai.....	128	10,7	10,4	43,8
Juin.....	120	—	7,4	108,0
Juillet.....	125	—	10,0	49,0
Octobre.....	125	6,3	6,5	28,5
Novembre.....	100	8,8	6,6	28,0
Novembre.....	108	4,0	5,9	19,0
Novembre.....	113	—	6,4	26,5
Novembre.....	117	4,5	—	22,0
Décembre.....	102	9,7	8,9	12,2
Décembre.....	107	10,0	7,4	11,5
Décembre.....	114	9,5	6,0	13,9
Décembre.....	119	11,2	6,3	25,7
Décembre.....	119	—	6,3	24,7
Décembre.....	120	9,4	5,2	16,4
Décembre.....	122	—	6,3	11,0

ses : les individus d'une même époque de ponte ne se développent pas avec la même vitesse, et par ailleurs les animaux de même taille ne sont pas forcément du même âge. Selon l'époque de la ponte, la première année d'existence de la Sardine, allant de l'éclosion de l'œuf à l'arrêt hivernal, peut-être plus ou moins longue, et la croissance de l'animal peut s'arrêter entre 8,8 et 11 cm.

TABLEAU XVI.

Activité phosphatasique relative des écailles de la Sardine au cours des second et troisième cycles annuels de croissance (du treizième au trente-sixième mois de vie) en Méditerranée.

Mois de capture	Taille (en mm.)	Année de vie de l'animal	Activité phosphatasique des écailles	
			Sans addition de SO_4Mg	En présence de SO_4Mg (M/500)
Janvier.....	120	Seconde	6,3	—
Janvier.....	128	Seconde	6,0	—
Janvier.....	130	Troisième	5,0	—
Février.....	123	Seconde	4,6	4,1
Février.....	127	Seconde	3,5	4,5
Février.....	134	Troisième	7,0	4,5
Mars.....	123	Seconde	19,2	21,1
Mars.....	127	Troisième	39,0	38,0
Mars.....	130	Troisième	31,0	52,0
Mars.....	130	Troisième	31,0	61,0
Mars.....	145	Troisième	54,0	70,0
Mai.....	115	Seconde	79,0	—
Mai.....	120	Seconde	87,0	—
Mai.....	127	Seconde	97,0	—
Mai.....	130	Troisième	113,0	—
Juillet.....	120	Seconde	28,0	—
Juillet.....	125	Seconde	30,4	50,0
Juillet.....	130	Troisième	11,2	—
Juillet.....	130	Troisième	11,5	—
Juillet.....	131	Seconde	10,5	—
Juillet.....	132	Troisième	9,4	—
Juillet.....	135	Troisième	9,3	—
Octobre.....	125	Seconde	6,1	5,1
Octobre.....	135	Troisième	6,0	11,0
Octobre.....	140	Troisième	6,3	20,3
Novembre.....	117	Seconde	5,9	4,7
Novembre.....	120	Seconde	4,4	—
Novembre.....	130	Troisième	4,5	—
Novembre.....	135	Troisième	4,1	—
Décembre.....	120	Seconde	6,8	13,0
Décembre.....	132	Troisième	5,2	17,2

Il en découle que la détermination de l'âge des animaux à partir de leur longueur totale n'est pas toujours très rigoureuse. Cependant la valeur moyenne des résultats permet d'établir un certain nombre de faits que nous allons exposer plus bas.

4. — Discussion des résultats et conclusions.

Le tableau XVII rassemble les variations moyennes de l'activité phosphatasique des os de Sardines en fonction de l'âge des animaux, établi d'après la figure 9 et le tableau XIII.

TABLEAU XVII.

Variations de l'activité phosphatasique relative moyenne de diverses pièces squelettiques de la Sardine à des étapes successives de son développement en Méditerranée.

Mois de capture	Taille moyenne (en mm.)	Variations de l'activité phosphatasique moyenne des			
		Voutes craniennes	Vertèbres	Nageoires caudales	Ecailles
A. — Première année de vie.					
de I à III.....	de 25 à 40	de 30 à 40	de 20 à 25	—	—
de III à IV....	de 40 à 50	de 40 à 42	de 25 à 35	—	—
de IV à V.....	de 50 à 65	de 42 à 23	de 35 à 18	—	—
de V à VI.....	de 65 à 80	de 23 à 28	de 18 à 22	de 65 à 100	—
de VI à VIII..	de 80 à 90	de 28 à 22	de 22 à 20	de 100 à 90	—
de VIII à X...	de 90 à 95	de 22 à 13	de 20 à 10	de 90 à 40	—
de X à XII....	de 95 à 100	de 13 à 10	de 10 à 8	de 40 à 20	—
B. — Seconde (2) et troisième (3) années de vie.					
de I à II.....	(2) 100 et (3) 130	de 9 à 10	8	de 20 à 25	de 5 à 6
de II à IV....	106 et 132	de 10 à 12	de 8 à 10	de 25 à 44	de 6 à 90
de IV à VI....	120 et 136	de 12 à 14	de 10 à 11	de 44 à 50	de 90 à 95
de VI à VIII..	125 et 139	de 14 à 10	de 11 à 9	de 50 à 35	de 90 à 10
de VIII à IX..	128 et 140	de 10 à 9	de 9 à 8	de 35 à 28	de 10 à 5
de IX à XII...	130 et 140	9	8	de 28 à 20	5

(1) L'activité phosphatasique des os étant très voisine chez les animaux pendant les seconde et troisième années de vie, nous n'avons indiqué dans le tableau XV que les données expérimentales obtenues sur des pièces squelettiques provenant de Sardines au cours de leur seconde année de croissance. Les valeurs moyennes figurant dans le tableau XVII ont été calculées à partir de l'ensemble de nos résultats relatifs aux divers os des animaux étudiés pendant la seconde et la troisième année de vie.

La discussion de ces résultats expérimentaux, faite à partir de valeurs moyennes, élimine les erreurs et les difficultés provenant de l'importance des écarts individuels dont nous avons expliqué la provenance plus haut et qui découlent d'ailleurs des particularités du développement de la Sardine.

1° ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE ET VITESSE DE CROISSANCE RELATIVE DES DIVERSES PIÈCES SQUELETTIQUES.

Les diverses pièces squelettiques de la Sardine présentent une différence d'activité phosphatasique qui demeure appréciable, en dehors des variations relevant du degré de développement de l'animal examiné ou de la saison (période de croissance ou de repos). Il est remarquable que la teneur en enzyme des os par ordre de richesse décroissante soit la suivante : nageoire caudale, voûte crânienne, vertèbres. Or, l'organe osseux qui se développe le plus rapidement, à cause d'une usure continue importante, est justement la nageoire caudale. D'autre part, les os du crâne ont pendant la plus grande partie de la vie un développement plus intense que ceux du rachis. Ces faits mettent donc en relief un certain parallélisme entre l'activité phosphatasique d'un os et sa vitesse de développement quelle que soit la saison. Il est intéressant de noter que la nageoire caudale durant la période dite « de repos » présente à l'encontre de tous les autres organes osseux, une teneur phosphatasique relativement très élevée. Ceci est sans doute en relation avec le fait que certains rayons des nageoires caudales réparent sans interruption l'usure des extrémités libres.

Quant aux écailles, elles présentent une variation saisonnière si grande d'activité qu'elles ne peuvent être comparées aux autres os. Leur teneur en phosphatase, minime d'octobre à février, devient très importante en mars-avril.

2° ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE DES OS ET DÉVELOPPEMENT DU SQUELETTE.

La croissance de la Sardine, qui suit un rythme très particulier du fait des différentes phases de la première année de vie et des poussées saisonnières de développement, présente un parallélisme constant avec les modifications importantes

de l'activité phosphatasique des organes osseux. Les graphiques des figures 10, 11 et 12 établies à partir des résultats groupés dans les tableaux XIV, XV, XVI et XVII, schématisent ces modifications.

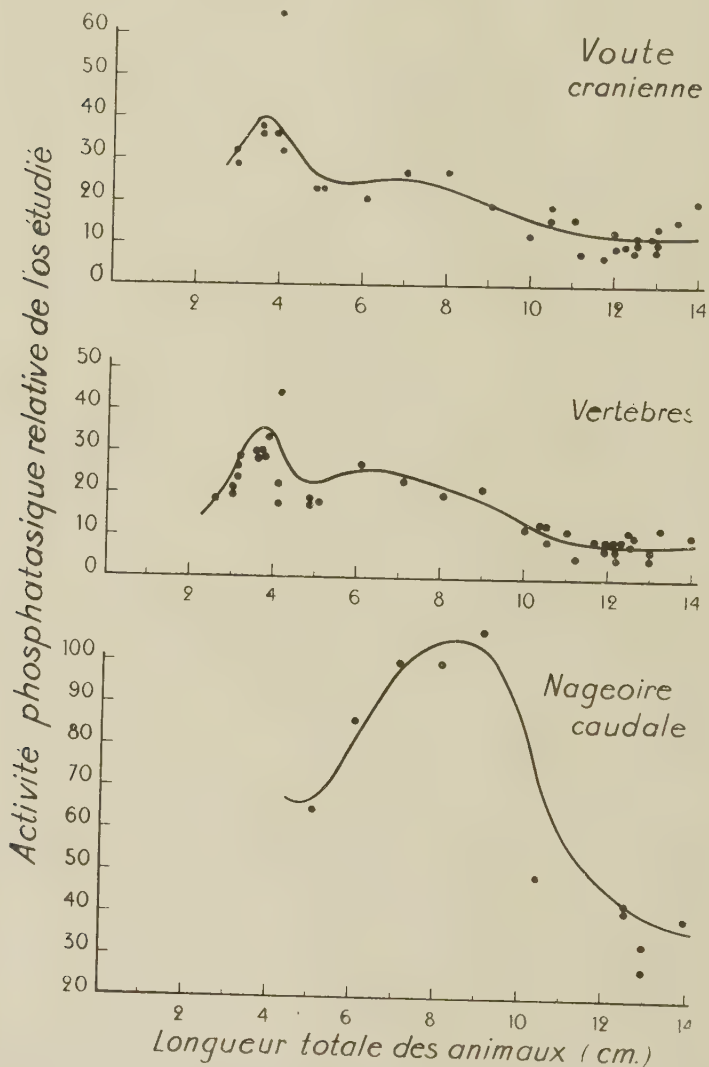


FIG. 11. — Activité phosphatasique relative des os de la voûte crânienne, des vertèbres et de la nageoire caudale chez des Sardines méditerranéennes de diverses tailles en période de croissance (de mars à juillet).
Abscisses : longueur totale des animaux (cm.).
Ordonnées : activité phosphatasique relative.

Au cours du printemps, période de croissance active, le squelette de la Sardine présente suivant la taille des animaux une teneur en phosphatase variable. La figure 11 rend compte de ces modifications. La comparaison des graphiques relatifs aux variations de la voûte crânienne, des vertèbres, de la nageoire caudale (fig. 11), et de ceux relatifs à la vitesse d'allongement corporel, (fig. 9, tableau XIII), fait ressortir un certain parallélisme.

Pendant les stades larvaire et post-larvaire les alevins grandissent de plus en plus rapidement ; parallèlement leur squelette s'enrichit en enzyme. En quatre mois ils atteignent 45-50 mm. et subissent alors la métamorphose caractérisée par un ralentissement général de leur développement, très net pour le crâne, et total pour le rachis. Or, avant la métamorphose la croissance est considérable : la taille augmente du simple au double pour le tronc, du simple au triple pour la tête et la queue. Pendant la métamorphose le tronc ne s'allonge pas ; seules la tête et la queue subissent une légère modification.

L'examen de la figure 11 montre que précisément, lorsque l'animal atteint 45 à 50 mm., la richesse en phosphatase des os subit une chute importante, plus accentuée pour les vertèbres que pour la voûte crânienne. Puis, une fois cette « crise de croissance » traversée, le développement des immatures reprend, s'accélère entre 50 et 60 mm. On constate que l'activité phosphatasique augmente de nouveau progressivement ; toutefois elle n'atteint jamais le degré d'intensité de la période post-larvaire. Ensuite, à partir du moment où l'alevin dépasse 75 mm., elle décroît peu à peu, à mesure que la croissance ralentit. La teneur en phosphatase de toutes les pièces squelettiques varie donc au cours de la croissance d'une manière plus ou moins importante et cela parallèlement à la vitesse du développement.

Il en est de même au cours des périodes saisonnières de croissance des années ultérieures. Les fig. 12 et 13, sur lesquelles ont été reportés les résultats que nous avons obtenus sur les os de Sardines âgées de deux à trois ans, en rendent compte. Il ressort de leur examen que l'activité phosphatasique des os de la Sardine adulte subit au cours de l'année des modifications appréciables en relation avec la période de croissance et avec la période de repos décrites par FAGE.

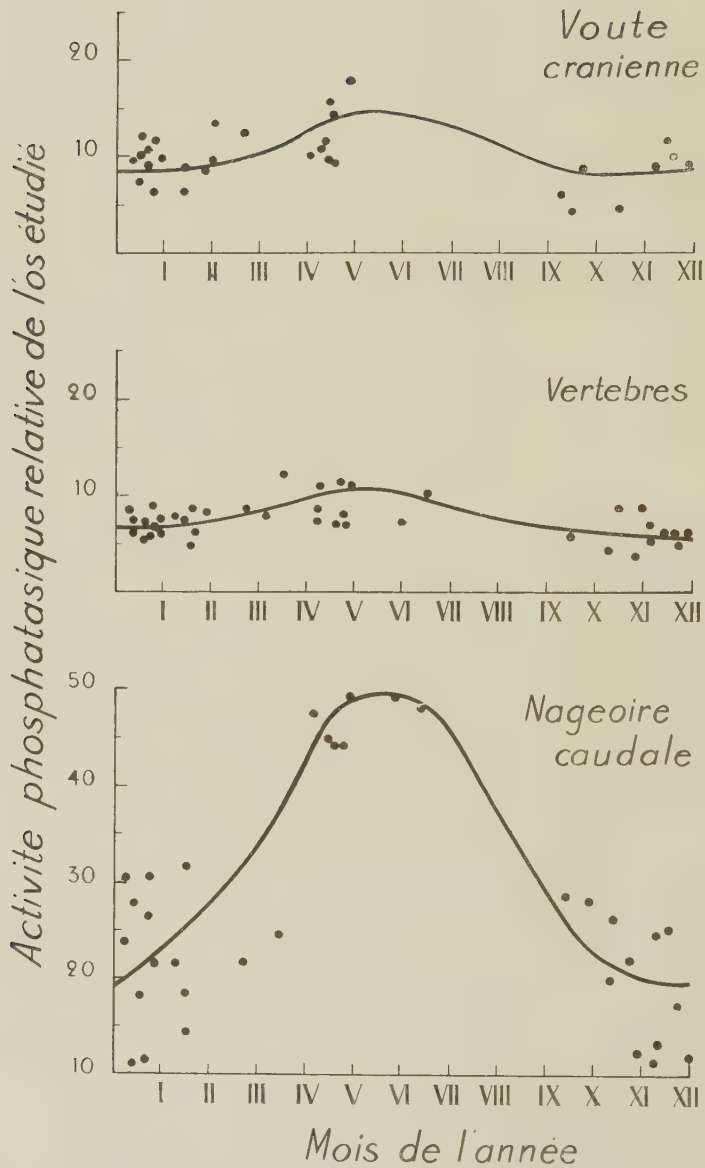


FIG. 12. — Activité phosphatasique relative des os de la voûte crânienne, des vertèbres et de la nageoire caudale chez la Sardine de la Méditerranée au cours de la deuxième année de vie (2).

Abscisses : mois de l'année (de I à XII).

Ordonnées : activité phosphatasique relative.

La poussée d'allongement a lieu annuellement de mars en août. L'activité phosphatasique, faible en hiver, croît progressivement au printemps, persiste durant l'été, puis décroît pour atteindre en automne la valeur minimum qui se maintiendra tout l'hiver.

Un fait est mis en relief dans la fig. 12 : l'augmentation de l'activité phosphatasique revêt une importance très inégale dans les divers os. Cette différence notable de l'augmentation printanière de l'activité phosphatasique doit être reliée à des modalités de croissance propres à chaque type d'os. Un exemple typique en est fourni par les écailles. Il est possible de constater par un examen macroscopique que les écailles aux mois d'avril et de mai se développent beaucoup plus vite que les os somatiques. La fig. 13 est significative à cet égard : elle traduit la variation de la teneur en enzyme des écailles au cours de l'année. Celles-ci sont des os de membrane typique, de structure beaucoup plus simple et homogène que les autres pièces squelettiques telles que la voûte crânienne ou les vertèbres.

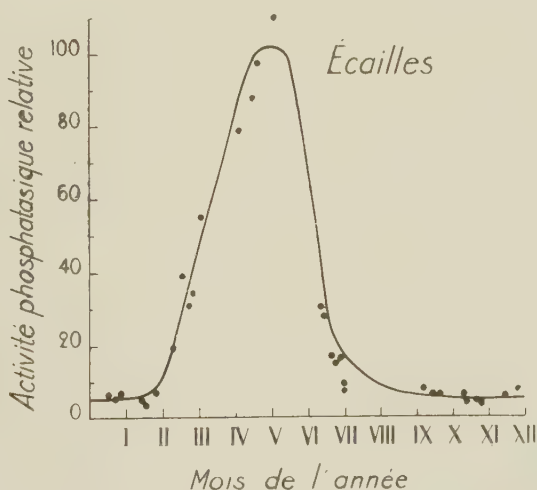


FIG. 13. — Activité phosphatasique relative des écailles chez la Sardine de la Méditerranée au cours des deuxièmes et troisièmes années de vie.

Abscisses : mois de l'année (de I à XII).

Ordonnées : activité phosphatasique relative.

Or, la croissance saisonnière des écailles, qui s'effectue presque sans remaniements haversiens, et assez intense pour servir de test de la poussée printanière (FAGE). Cette augmentation de l'activité phosphatasique des écailles est à la fois brusque, rapide et peu durable. Elle apparaît en mars, atteint son maximum en mai, puis décroît jusqu'à un minimum auquel elle se maintiendra durant toute la période de repos. L'allongement initial de taille des écailles coïncide avec l'enrichissement en phosphatase. Pendant cette première période le parallélisme est des plus net. Mais il est à noter que l'augmentation de l'activité phosphatasique a presque disparu en juillet, alors que l'écaille n'achève son développement qu'en août. Ce fait est analogue à celui observé chez les Mammifères, dont les os ne présentent une activité phosphatasique intense que durant la première étape de leur croissance (ROCHE, FILIPPI, LÉANDRI [17])

3. *Modifications saisonnières de l'activité phosphatasique des os, unité physiologique du squelette et coordinations hormonales probables.*

Les variations de l'activité phosphatasique des os de la Sardine au cours de la période de croissance saisonnière (fig. 12), présentent un caractère remarquable à savoir : *une simultanéité parfaite dans toutes les pièces squelettiques*. Quel que soit l'organe osseux, l'activité phosphatasique subit avec des intensités variables une augmentation similaire, témoignant de l'unité physiologique du système osseux (ROCHE et MARCELET).

La poussée saisonnière chez la Sardine est comparable en cela à la « réaction générale » du squelette observée dans l'ensemble du système osseux du Rat ou du Pigeon après fracture d'un os (ROCHE et FILIPPI [16]).

Les anneaux concentriques apparents sur les écailles et les coupes des diverses pièces osseuses traduisant les poussées de croissance saisonnières, sont également visibles sur les otolithes, concrétions calcaires, incluses dans l'oreille interne. On a depuis longtemps observé que « les zones de crois-

sance ainsi observées, correspondaient d'une façon générale, aux zones de croissance relevées sur l'écaïlle » (LE GALL loc. cit. p. 385 [7]). Or, les otolithes sont constitués presque exclusivement de carbonate de calcium (96 p. 100 selon CHAINE et DUVERGIER [2]). Il est donc certain que les modifications de l'état du calcium dans les humeurs des Poissons, dont l'intérêt a été démontré par PORTIER et FONTAINE [10], vont de pair avec l'augmentation phosphatasique du squelette. L'ensemble de ces manifestations de la « reprise » printanière de la croissance osseuse doit relever probablement de la mise en jeu de mécanismes hormonaux dont l'étude mériterait d'être entreprise.

Enfin, s'il existe une unité physiologique remarquable entre les diverses pièces du squelette, il en existe une non moins remarquable reliant le squelette aux autres organes. Le ralentissement de croissance général dans tout le squelette est parallèle à la fonte des graisses et à l'élaboration des produits génitaux. Les travaux de L. FAGE et R. LEGENDRE [4] sont, à cet égard, démonstratifs. Les réserves lipidiques de la Sardine correspondent au début de la seconde année, au mois de mars, à 3,61 p. 100 de son poids total. Au cours de cette seconde année l'animal engraisse et BOUNHIOL constate que « les Sardines sont très adipeuses de mai à octobre ». En mars de la troisième année les animaux ne contiennent plus que 3,06 p. 100 de lipides, soit moins qu'en mars de la seconde année. Cet amaigrissement coïncide avec la première ponte car, en Méditerranée, la Sardine n'arrive « à maturité sexuelle qu'à la fin de sa deuxième année » (FAGE loc. cit. p. 42 [4]). En août la Sardine a accumulé d'importantes réserves lipidiques (9,27 p. 100). A cette époque les glandes sexuelles sont rudimentaires ; leur développement qui débute en octobre coïncide avec un léger amaigrissement, qui devient très notable en mars après la seconde ponte (2,29 p. 100 de graisse). Notons en passant que, selon FAGE, la somme du pourcentage de l'eau et des matières grasses est sensiblement constant (77 p. 100). Ainsi à poids égal l'animal présente une valeur nutritive très différente et pouvant être déterminée à l'avance par la connaissance de la saison de ponte. La croissance et l'engraissement saisonniers apparaissent à la belle saison, tandis qu'en automne et en hiver se manifeste l'élaboration des produits génitaux, parallèlement à la fonte des graisses et à l'arrêt de croissance.

« Ces phénomènes liés entre eux, seraient déclenchés soit par les conditions thermiques (abaissement de température, non absolu), soit par le début de la disette provoquée par la destruction du plankton » (MURAT [9]). Cependant la concomitance existant entre ces phénomènes permet de supposer un rapport d'effet à cause entre l'arrêt de la croissance et de la fonte des graisses d'une part, la maturation sexuelle d'autre part. Cette dernière est elle même sous la dépendance d'un mécanisme endocrinien qui ne peut être exposé ici dans le détail.

4. *Identité du rôle physiologique de la phosphatase des os dans les diverses classes de Vertébrés et biochimie générale de l'ossification.*

L'universalité de la répartition de la phosphatase dans les os des Vertébrés est actuellement bien établie (ROBISON, ROCHE), mais l'on peut se demander si le rôle de cet enzyme est identique dans les divers processus d'ossification contribuant à la formation du squelette chez tous les animaux. Comme l'a démontré ROBISON dès ses premiers travaux, l'activité de la phosphatase produit un enrichissement local en ions phosphoriques permettant la formation de phosphate tricalcique. Toutefois, la teneur des os en cet enzyme est susceptible de présenter des variations considérables et, de ce fait, le rôle physiologique de la phosphatase est nécessairement sous la dépendance de son taux.

Chez les Mammifères et chez les Oiseaux, les os sont très riches en phosphatase pendant la vie embryonnaire et les premiers stades de la croissance (ROBISON et FELL [13], ROBISON et NIVEN [14], mais tout leur développement ultérieur (adulthood) s'opère pratiquement en l'absence de cet enzyme (ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [17]). De même, la formation des dents chez les Sélaciens ne va de pair avec une activité phosphatasique intense qu'au début de la calcification de ces organes (ROCHE et BULLINGER [15]). Quant aux poussées de croissance osseuse des Téléostéens jeunes ou adultes, elles ne comportent une participation de la phosphatase que si elles évoluent très rapidement. En effet, les os du crâne et les vertèbres de la Sardine ne sont très riches en enzyme que pendant les premiers mois de la vie et, par ailleurs, seuls les os

présentant une croissance périodique intense (écailles et rayons de la nageoire caudale) sont le siège d'une grande activité phosphatasique pendant la « période d'allongement » printanière chez les animaux adultes. Par contre, la teneur en enzyme des os est toujours minime quand leur croissance est nulle ou très lente (1) ; son augmentation saisonnière dans les vertèbres et la voûte crânienne des Sardines âgées de deux à trois ans est à peine décelable.

Le rôle physiologique de la phosphatase dans l'ossification est donc identique chez tous les Vertébrés, quelle que soit la structure des pièces squelettiques et les modalités particulières du rythme de la croissance. Le mécanisme local de ravitaillement des os en ions phosphoriques auquel participe l'enzyme est l'un des éléments constants de tout processus ostéogénétique rapide, car il permet la calcification des pièces squelettiques au fur et à mesure de la formation de leur matrice endochondrale ou membraneuse. En revanche, le rôle de la phosphatase devient d'autant moins important que la vitesse de la croissance osseuse diminue, car l'apport humoral direct d'ions phosphoriques d'origine sanguine peut permettre à lui seul la minéralisation des os à condition que ceux-ci se développent assez lentement.

B. — Etude de l'activité phosphatasique des dents à divers stades de leur évolution chez un Sélacien [*Carcharias Glaucus* (L.)].

ROBISON, MAC FARLANE et PATTERSON ont signalé la présence d'une phosphatase dans les dents de Lapin ; en dehors des recherches de ces auteurs il n'exige pas, à notre connaissance, de données quantitatives relatives à cet enzyme, dont l'identité avec celui des os a été mentionnée dans le chapitre II.

(1) Il existe toutefois à cet égard une différence entre les os des Mammifères et ceux des Poissons adultes, différence tenant peut-être à la plus grande intensité des remaniements haversiens chez les premiers. Le squelette de Mammifères adultes est pratiquement dépourvu de pouvoir phosphoestérasique faute d'activateurs, mais il demeure assez riche en phosphatase, laquelle manifeste son activité *in vitro* en présence d'ions Mg^{++} . Au contraire les os des Poissons adultes ne contiennent presque pas d'enzyme en hiver ; ils ne peuvent alors dédoubler énergiquement les esters phosphoriques même en présence d'activateurs (SO_4Mg). L'augmentation saisonnière de leur pouvoir phosphoestérasique est donc due à une sécrétion d'enzyme.

Chez les Poissons les dents offrent la particularité d'être en voie de remplacement de manière ininterrompue. Nous avons déjà souligné dans le chapitre précédent que, chez les Téléostéens aussi bien que chez les Sélaciens, ces organes possèdent un pouvoir estérasique beaucoup plus élevé que celui de la pièce mandibulaire où elles sont implantées, même chez un animal âgé. Ce fait est sans doute en relation avec le développement continu de ces organes dentaires à croissance rapide. « Chez tous les Poissons, le renouvellement des dents a lieu d'une manière continue : sur les machoires les dents usées sont remplacées par des dents nouvelles qui apparaissent en dedans des premières ou plus rarement à côté » [3]. Chez les Sélaciens ce phénomène naturel prend, du fait de sa fréquence exceptionnelle, un intérêt tout particulier. Cette modalité de la dentition des Sélaciens rend l'expérimentation doublement intéressante : elle offre d'une part toutes les facilités pour étudier un problème qui ne peut faire chez les autres Vertébrés que l'objet d'études techniquement très délicates (dissection des bourgeons dentaires), et permet d'autre part de généraliser les résultats obtenus car « si l'on compare la succession en nombre indéfini des dents des Sélaciens aux deux dentitions des mammifères, on reconnaît qu'il n'y a entre elles aucune différence » (POUCHET et BEAUREGARD, *loc. cit.*, p. 44 [11]).

1. — *Matériel d'étude et techniques.*

Le Professeur J. ROCHE et Mlle E. BULLINGER ont poursuivi des recherches sur quatre Elasmobranches appartenant au sous-ordre des Sélaciens, à savoir : le Requin peau bleue [*Carcharias Glaucus* (L.)], la Lamie long nez [*Isurus cornubicus* (GMEL)], la Roussette [*Scylliorhinus stellaris* (L.)], et la Torpille [*Torpedo marmorata* (Risso)]. Les dents ont été disséquées, rangées par rangées, et examinées séparément ainsi qu'une portion de la matrice attenante. Pour le Requin peau bleue il a été possible d'opérer sur quatre individus de tailles différentes, deux sujets encore en croissance mesurant 1 m. 22 (n° I et n° II), un adulte de 1 m. 62 (n° III), et un sujet âgé, de 2 m. 25 (n° IV). Comme le même animal présente plusieurs rangées de dents à diverses étapes de développement, il a été possible pour le Requin peau bleue de séparer ces dents, imbriquées les unes sous les autres, en six lots correspondant aux

différentes étapes de l'évolution, depuis le stade d'ébauche muqueuse jusqu'à celui d'organe à forte calcification.

Chez une Roussette adulte de 96 cm., trois rangées de dents ont été disséquées. Sur tous ces lots de dents et sur la matrice on a procédé au dosage premièrement de l'activité phosphatasique, secondement du rapport : P/N, rendant compte du degré de calcification. Ceci a permis de comparer la valeur de l'activité phosphatasique d'un tissu osseux à son degré de calcification.

L'activité phosphatasique a été dosée par la méthode de ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI, mise en œuvre dans les mêmes conditions que précédemment (voir p. 49) avec cette différence que tous les essais ont été effectués en présence de sulfate de magnésic à concentration égale à $q \text{ Mg} = 2,5$.

L'établissement du rapport : P/N, rendant compte de la calcification comprend le dosage du phosphore par la méthode de BRIGGS et le dosage de l'azote par microkjeldahl. Les valeurs du rapport : P/N, ne peuvent être considérées comme très rigoureuses du fait que la précision du dosage du phosphore employé ne dépasse pas 5 p. 100. Cependant elles donnent une idée suffisante du degré de calcification du tissu.

2. — Résultats expérimentaux et discussion des résultats.

Nous empruntons au Professeur ROCHE et Mlle E. BULLINGER [15] le tableau XVIII dans lequel sont rassemblés les résultats relatifs aux dents à différents stades de développement de plusieurs Sélaciens.

Les données du tableau XVIII sont démonstratives. L'activité phosphatasique, considérable dans les dents à l'état de simple ébauche muqueuse, diminue progressivement au fur et à mesure que celles-ci évoluent et se calcifient ; elle atteint finalement sa valeur minima dans la rangée la plus externe, comprenant les dents les plus anciennes. Entre la teneur en enzyme à ce dernier stade de l'évolution et dans les dents les plus jeunes, le rapport est de 1 à 50. En résumé, *la teneur en phosphatase des dents bien calcifiées, en fin de croissance, est très faible comparativement à celle des dents jeunes aux premiers stades de leur développement.*

TABLEAU XVIII.

Activité phosphatasique relative, teneur en phosphore (P) et en azote (N) p. 100 du poids frais et rapport : P/N, des dents et de leur point d'implantation cutané (matrice) chez divers Poissons cartilagineux.

Animal	Organe ou tissu	Activité phosphatasique	P p. 100	N p. 100	P/N
<i>Carcharias glaucus</i> I.....	Matrice	113,0	8,28	6,24	1,32
— I.....	Dents, 1 ^{er} rang	26,9	14,90	3,74	3,98
— I.....	Dents, 2 ^e rang	162,3	12,63	2,36	5,35
— I.....	Dents, 3 ^e rang	392,5	8,86	2,72	3,25
— I.....	Dents, 4 ^e rang	612,0	8,12	2,51	3,23
— I.....	Dents pointe calc. 5 ^e rang	842,0	2,31	1,58	1,46
— I.....	Dents non calc. 6 ^e rang	1774,0	0,97	2,39	0,40
<i>Carcharias glaucus</i> II.....	Matrice	27,0	1,64	5,29	0,31
— II.....	Dents, 1 ^{er} rang	27,6	10,70	3,37	3,17
— II.....	Dents, 2 ^e rang	93,2	9,27	3,22	2,98
— II.....	Dents, 3 ^e rang	321,1	9,64	3,01	3,20
— II.....	Dents, 4 ^e rang	280,1	5,86	5,41	1,08
— II.....	Dents non calc. 6 ^e rang	1154,0	0,65	2,39	0,27
<i>Carcharias glaucus</i> III.....	Matrice	16,5	1,37	4,64	0,25
— III.....	Dents, 1 ^{er} rang	4,7	9,34	3,19	2,93
— III.....	Dents, 2 ^e rang	23,0	8,44	3,81	2,21
— III.....	Dents, 3 ^e rang	132,0	5,53	2,76	2,04
— III.....	Dents, 4 ^e rang	278,0	2,29	2,10	1,09
— III.....	Dents peu calc. 5 ^e rang	770,0	3,11	2,19	1,48
— III.....	Dents pointe calc. 6 ^e rang	664,0	0,45	2,29	0,20
— III.....	Dents non calc. 6 ^e rang	266,5	—	2,39	—
<i>Carcharias glaucus</i> IV.....	Matrice	7,6	—	9,46	—
— IV.....	Dents, 1 ^{er} rang	3,86	16,02	3,98	2,52
— IV.....	Dents, 3 ^e rang	524,0	3,33	2,59	1,23
— IV.....	Dents pointe calc. 5 ^e rang	1332,0	—	1,98	—
— IV.....	Dents début calc. 6 ^e rang	673,0	5,66	5,67	0,99
<i>Isurus cornubicus</i> I.....	Matrice	33,4	—	3,74	—
— I.....	Dents calcifiées	46,8	—	5,10	—
<i>Scylliorhinus stellaris</i> I.....	Dents et matrice	52,4	—	6,57	—
— II.....	—	48,3	—	4,12	—
— III.....	Matrice	34,1	—	4,79	—
— III.....	Dents mélangées	82,5	—	4,91	—
— IV.....	Matrice	65,7	2,79	5,24	0,53
— IV.....	Dents grande taille	27,5	3,89	3,76	1,03
— IV.....	Dents petite taille	118,1	4,12	3,30	1,25
— IV.....	Dents non calcifiées	453,0	0,42	2,83	0,14

Les dents possèdent au début de leur calcification un pouvoir phosphoestérasique beaucoup plus grand que celui des os des jeunes Mammifères ; les valeurs contenues dans le tableau XVIII et se rapportant aux premiers stades de la formation des dents sont en effet d'un ordre de grandeur de cinq à dix fois plus élevé que celui de l'activité phosphatasique des

fémurs ou des tibias de Rats nouveaux nés (ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [17]). Toutefois, chez les Squalés, les dents des rangées profondes, en particulier les ébauches muqueuses dont le rapport : P/N, est notablement inférieur à 1, ne sauraient être comparées avec rigueur qu'aux os embryonnaires, au sujet desquels nous ne possédons pas de données quantitatives susceptibles d'être rapportées ici.

Bien qu'il ne soit pas possible de relier étroitement le degré de calcification des dents — mesuré par le rapport : P/N — à la valeur de leur activité phosphatasique, il ressort néanmoins d'un examen comparatif, que les dents sont le siège d'une activité phosphatasique considérable antérieurement à la période de calcification intense, et que, par contre, elles en sont pauvres au moment où la minéralisation devient particulièrement forte.

Ces faits démontrent à nouveau que le mécanisme phosphatasique de ravitaillement en ions PO_4^- des organes osseux et l'aptitude de ceux-ci à fixer des sels participent de manière indépendante à l'ossification. Il y a tout lieu de les rapprocher d'observations faites, les unes par ROBISON et FELL [13], ROBISON et NIVEN [14] sur l'apparition de l'activité phosphatasique dans les os embryonnaires, les autres par ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [17] sur les modifications de la teneur en enzyme des os longs au cours de la croissance. Les premières établissent en effet que la phosphatase exerce son activité dans les pièces squelettiques des embryons avant même que celles-ci ne se calcifient et les secondes démontrent que, chez les animaux en croissance, un enrichissement considérable en sels a lieu en dehors de toute activité phosphatasique intense, à la fin du développement. Or, il en est exactement de même pour les dents des Sélaciens. Les dents encore à l'état d'ébauche muqueuse sont très riches en enzyme ; elles produisent déjà celui-ci avant d'être aptes à se calcifier. Par la suite, elles conservent un pouvoir phosphoestérasique élevé pendant la première partie de leur formation, au cours de laquelle elles se calcifient intensément. Enfin, lorsque cette période de croissance rapide est terminée, les organes ayant à peu près atteint leur taille maxima fixent des sels en abondance — ce que traduit l'augmentation du rapport : P/N — sans présenter une grande activité phosphatasique.

De même dans les boucles (os dermiques) de la Raie clou-

tée, les parties les plus riches en enzyme ne sont pas les zones calcifiées, mais celles, encore molles, en voie de calcification (MOURGUE).

Les résultats obtenus par le Professeur J. ROCHE et E. BULLINGER permettent donc de considérer que la phosphatase joue dans la formation des dents le même rôle que dans celle des os, à savoir celui d'un agent accélérateur de la calcification, pouvant être physiologiquement très utile à celle-ci sans lui être pourtant indispensable. Ils établissent par ailleurs que des processus identiques régissent la formation de ces divers organes.

C. — Conclusions.

1. — *Recherches sur l'ossification du squelette chez un Téléostéen (Clupea pilchardus Walb.).*

L'ensemble des recherches précédentes permet d'établir les faits suivants :

I. — Les vertèbres et la voûte crânienne (pièces osseuses à croissance périodique) sont moins riches en phosphatase que la nageoire caudale (organe contenant pratiquement toujours des rayons en voie de développement), et cela quelle que soit la taille des animaux et en toute saison.

II. — Pendant la première année de vie, l'activité phosphatasique de tous les organes augmente d'abord considérablement, puis elle diminue au moment de la métamorphose, « crise de croissance » caractérisée par un ralentissement général du développement et par l'arrêt total de croissance du rachis ; elle reprend ensuite une intensité plus grande qui demeure proportionnelle à la vitesse de l'allongement corporel jusqu'à l'arrêt hivernal survenant avec la saison froide.

III. — La poussée saisonnière d'allongement se manifeste au printemps chez la Sardine adulte. En même temps apparaît une augmentation de la teneur en phosphatase du squelette. Celle-ci diminue ensuite pour atteindre son minimum qu'elle conserve pendant toute la période d'arrêt. L'augmentation de l'activité phosphatasique est particulièrement accentuée dans des os, comme les écailles, présentant un accroissement de taille notable au printemps, alors qu'elle est rela-

tivement faible au niveau d'os, comme les vertèbres ou la voûte crânienne, dont la croissance saisonnière est moindre.

IV. — Ces observations et des faits de même ordre établis antérieurement sur les os des Mammifères et des Oiseaux traduisent la participation universelle de la phosphatase à tous les processus d'ossification au cours de la croissance des Vertébrés.

2. — *Recherches sur la formation des dents chez divers Sélaciens.*

I. Les dents, organes à croissance continue chez les Poissons, sont très riches en enzyme, sauf dans la période qui précède immédiatement leur chute. Chez les Sélaciens où il existe plusieurs rangées de dents à divers degrés de développement, les organes jeunes non calcifiés présentent une activité phosphatasique considérable, tandis que tel n'est pas le cas des dents en fin de croissance.

II. Comme dans les os des Mammifères et des Oiseaux, l'activité phosphatasique et l'aptitude des dents des Sélaciens à fixer des sels sont indépendantes. En effet, il existe au début du développement de ces organes une période où les ébauches muqueuses de ceux-ci, bien que très riches en enzyme, ne se calcifient pas. Par contre, après avoir atteint leur taille maxima, les dents s'enrichissent en sels tout en ne présentant plus alors qu'un pouvoir phosphoestérasique assez faible.

III. La phosphatase joue probablement le même rôle dans la calcification des os et dans celles des dents chez tous les Vertébrés.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BODANSKY (S.), BAKWIN (R. M.) and BAKWIN (H.). — The distribution of phosphatases in the tissues of teleosts and elasmobranchs., *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **94**, 551-560.
2. CHAINE (J.) et DUVERGIER (J.). — Recherches sur les otolithes der Poissons. Etude descriptive et comparative de la Sagitta des Téléostéens. *Act. Soc. linn. Bordeaux.*, 1934, **86**, 1-254.
3. CLAUS (C.). — Traité de zoologie, traduit de l'allemand par G. MOQUIN-TANDON, 1 vol., 1163 p., F. Savy éd., Paris, 1878.

4. FAGE (L.). — Ergraulidae, Clupeidae, in : Reports of the Danish oecographical expeditions 1908-1910 to the mediterranean and adjacent seas, édité by J. Schmidt, leader of the expedition, 1920, Vol. II, fasc. A 9, 140 p., Chap. III : La Sardine (*Clupeus pilchardus* Walb.) 34-94.
 4. FAGE (L.) et LEGENDRE (R.). — Teneur des Sardines en eau et matières grasses. *C. R. Biol.*, 1914, **76**, 284.
 6. GOURRET (P.). — Les pêcheries et les Poissons de la Méditerranée, 1 vol., Paris, 1894.
 7. LE GALL (J.). — La scalimétrie et son importance en ichtyologie appliquée. *Rev. Trav. off. pêch. marit.*, 1931, **4**, 381-395.
 8. MARION (A. F.). — Recherches sur la Sardine de la Méditerranée. *Ann. Mus. Hist. nat. Marseille*, 1889, **3**, 69.
 9. MURAT (M.). — Contribution à l'étude de la Sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) de la baie de Castiglione I. La lecture de l'écaille. II. Quelques données biométriques. *Pub. Stat. aquicult. et pêche de Castiglione*. 1933, n° 2, 96-116.
 10. PORTIER (P.) et FONTAINE (M.). — Sur la teneur en calcium du sang des Poissons marins. *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **193**, 1218.
 11. POUCHET (G.) et BEAUREGARD (H.). — Traité d'ostéologie comparée. 1 vol., 464 p., G. Masson éd., Paris, 1889.
 12. ROBISON (R.). — Bone phosphatase. *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 1 vol. 375 p. Akad. Verlagsges. éd. Leipzig, pp. 280-294.
 13. ROBISON (R.) and FELL (H. B.). — The development of the calcifying mechanism in avian cartilage an in osteoid tissue. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 2243-2253.
 14. ROBISON (R.) and NIVEN (G. F. S.). — The development of the calcifying mechanism in the long bones of rabbits. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 2337-2342.
 15. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Recherches sur l'ossification. VII. La phosphatase du squelette (os, dents, dermosquelette) chez les Poissons osseux ou cartilagineux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 166-184.
 16. ROCHE (J.) et FILIPPI (A.). — *Idem*. V. Augmentation de l'activité phosphatasique du squelette après fracture d'un os et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 1146-1165.
 17. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et LÉANDRI (A.). — *Idem*. III. La phosphatase des os longs aux diverses étapes de la croissance. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314-1324.
 18. ROCHE (J.) et COLLET (J.). — *Idem*. VIII. Activité phosphatasique des divers organes osseux au cours du développement chez la Sardine et rôle de la phosphatase dans la formation du squelette. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1940, **22**, 245-262.
-

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

L'ensemble des recherches dont les résultats ont été exposés apporte une contribution à la biochimie comparée de l'ossification dont il convient de tirer des conclusions générales, tant en ce qui concerne les ordres de Poissons étudiés que l'embranchement des Vertébrés.

Tous les Poissons, qu'ils soient osseux ou cartilagineux, renferment une phosphatase (phosphomonoestérase A_1) dans les régions de leur squelette (os et dents) qui s'ossifient et le taux de cet enzyme est d'autant plus élevé dans celles-ci que leur calcification est plus rapide et plus intense. On peut donc à bon droit penser que la phosphatase, dont le rôle est de favoriser la formation du phosphate tricalcique en provoquant un enrichissement local en ions $PO_4^{=}$, intervient dans l'ossification indépendamment du processus histologique suivant lequel celle-ci a lieu. Toute production de « sel de l'os » s'opère par un mécanisme biochimique uniforme, quelle que soit la pièce squelettique considérée : os, dent ou pièce cartilagineuse. Ce qui différencie les unes des autres repose avant tout sur l'organisation de structures particulières, lesquelles n'interviennent que secondairement.

Le mécanisme phosphatasique de l'ossification est, par ailleurs, identique chez les Poissons, et chez les autres Vertébrés. Dans tous les cas, il apparaît et se développe de manière très précoce au cours de la croissance des organes osseux et son activité diminue en même temps que la vitesse de calcification d'un organe ou d'une région osseuse devient moins rapide. Aussi apparaît-il comme l'un des éléments fondamentaux de la calcification en période de croissance rapide, tandis que son rôle est secondaire, et peut-être même nul dans les étapes de la calcification des os au cours desquelles ces organes constituent leurs réserves minérales, mais ne se développent plus que lentement. L'existence dans les os ou les dents d'une activité

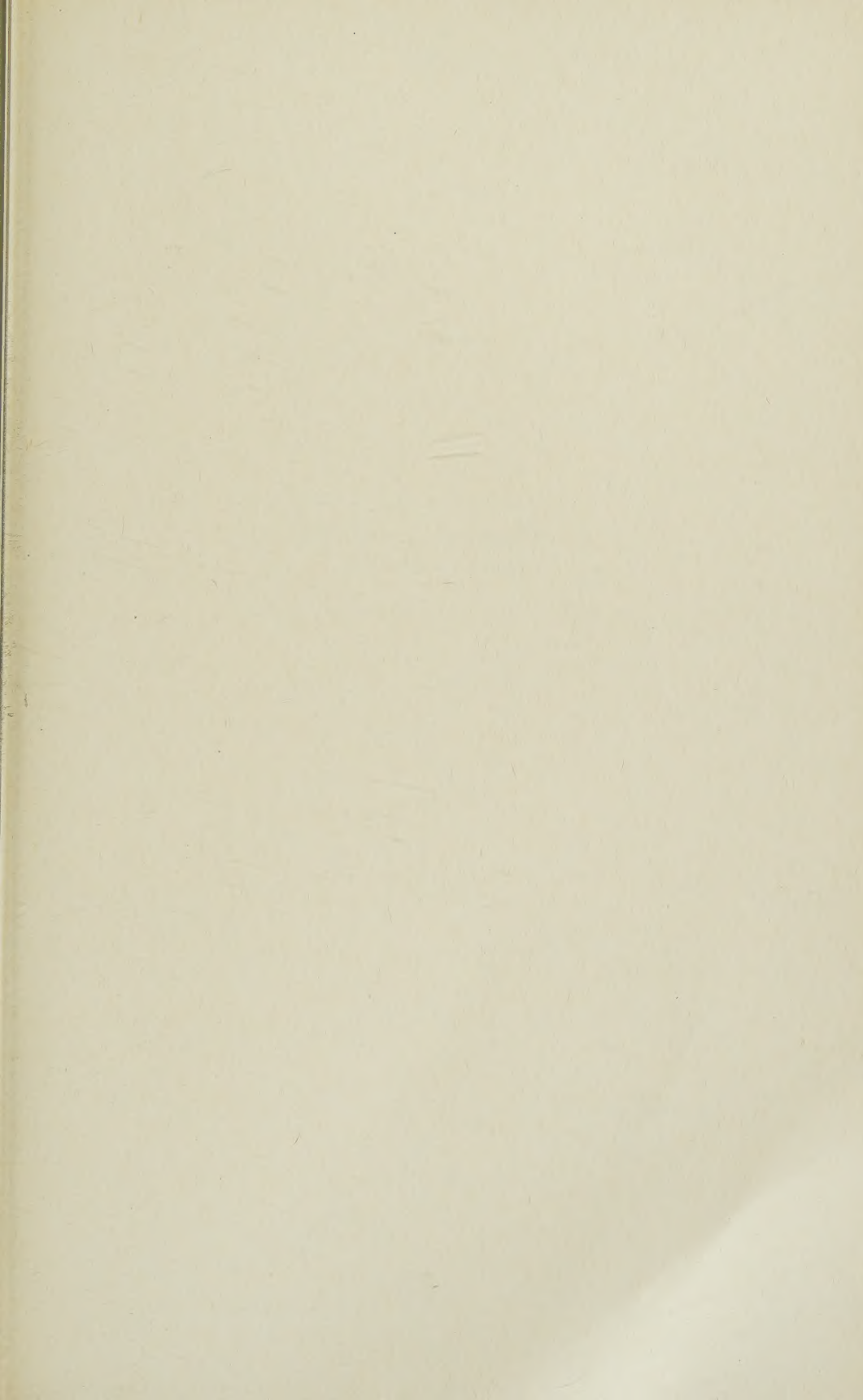
phosphatasique intense est donc caractéristique d'une calcification rapide. Une pièce squelettique en fin de croissance se calcifie abondamment grâce à l'effort direct d'ions PO_4^- et Ca^{++} par les humeurs, sans qu'un enrichissement local en les premiers soit nécessaire, parce qu'elle se minéralise lentement. Son aptitude à fixer les ions avec lesquels elle va constituer le « sel de l'os » est beaucoup plus réduite que celle du même organe au début de son développement et elle ne peut dès lors plus se minéraliser à un rythme aussi accéléré qu'aux premières étapes de la vie. Il serait physiologiquement inutile qu'elle soit riche en enzyme.

Ainsi, tandis que l'anatomie et l'histologie démontrent la diversité de forme et de structure des pièces squelettiques dans chaque espèce et chez les Vertébrés des divers ordres, la biochimie met en évidence l'universalité d'un des mécanismes fondamentaux de l'ostéogénèse. C'est là une illustration nouvelle de l'intérêt qui s'attache à la coordination des données recueillies par les morphologistes, tant anatomistes qu'histologistes, et les biologistes, tant physiologistes que biochimistes. La connaissance des phénomènes de la vie ne saurait faire d'importants progrès que par cette coordination, à laquelle la biochimie comparée doit nécessairement prendre une part importante.

Vu et approuvé :
Marseille, le 20 septembre 1940.
Le Président,
Jean ROCHE.

Vu et approuvé :
Marseille, le 25 septembre 1940
pour le Doyen, le Professeur délégué,
Jean ROCHE.

Vu et permis d'imprimer :
Aix, le 28 septembre 1940.
Le Recteur,
E. GAU.



IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

Imprimé en France.

